

(11) Número de Publicação: **PT 1522590 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12P 21/00** (2007.10) **C12N 1/14** (2007.10)

**C12N 9/24** (2007.10) **C12N 9/10** (2007.10)

**C12N 5/10** (2007.10) **C12N 15/62** (2007.10)

**C12R 1/645** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2001.06.27**

(30) Prioridade(s): **2000.06.28 US 214358 P**  
**2000.06.30 US 215638 P**  
**2001.03.30 US 279997 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.04.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.08.26**  
**207/2009**

(73) Titular(es):

**GLYCOFI, INC**

**21 LAFAYETTE STREET, SUITE 200 LEBANON**  
**NEW HAMPSHIRE 03766**

**US**

(72) Inventor(es):

**TILLMAN U. GERNGROSS**

**US**

(74) Mandatário:

**MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA**  
**AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS MODIFICADAS**

(57) Resumo:

**RESUMO****"MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS MODIFICADAS"**

Foram desenvolvidas linhas de células com vias de glicosilação geneticamente modificadas, que lhes permitem executar uma sequência de reacções enzimáticas, as quais mimetizam o processamento de glicoproteínas em seres humanos. As proteínas recombinantes expressas nestes hospedeiros modificados produzem glicoproteínas mais semelhantes ou mesmo substancialmente idênticas às suas equivalentes humanas. As células de eucariotas inferiores, que normalmente produzem N-glicanos contendo elevado teor de manose, incluindo fungos unicelulares e multicelulares, são modificadas de forma a produzirem N-glicanos, tais como  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  ou outras estruturas através das vias de glicosilação humanas. Este objectivo é atingido recorrendo a uma combinação da modificação e/ou selecção de estirpes que: não expressam certas enzimas, as quais criam as estruturas complexas indesejadas características das glicoproteínas fúngicas, que expressam enzimas exógenas seleccionadas ou para ter uma actividade óptima nas condições presentes nos fungos onde a actividade é desejada ou que são localizadas num organelo onde a actividade óptima é atingida e suas combinações, em que a célula eucariota geneticamente modificada expressa múltiplas enzimas exógenas, necessárias para produzir glicoproteínas "semelhantes às humanas".

## **DESCRIÇÃO**

### **"MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS MODIFICADAS"**

#### ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

##### Vias De Glicosilação

As proteínas sintetizadas *de novo* podem ser sujeitas a um processamento posterior nas células, conhecido por modificação pós-traducional. Em particular, podem ser adicionados enzimaticamente resíduos de açúcar por um processo conhecido por glicosilação. As proteínas resultantes, com cadeias laterais de oligossacarídeos com ligação covalente, são conhecidas como proteínas glicosiladas ou glicoproteínas. Tipicamente, as bactérias não glicosilam proteínas, nos casos em que ocorre a glicosilação, esta tem lugar normalmente em locais não específicos na proteína (Moens e Vanderleyden, Arch. Microbiol. 1997 168(3):169-175).

As células eucariotas ligam normalmente um oligossacarídeo específico à cadeia lateral de um resíduo asparagina da proteína, particularmente uma asparagina que ocorre na sequência Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys (em que Xaa representa qualquer aminoácido). Na sequência da ligação da fracção sacarídeo, conhecida como um N-glicano, podem ocorrer mais modificações *in vivo*. Tipicamente, estas modificações ocorrem segundo uma sequência ordenada de reacções enzimáticas, conhecida por uma cascata. Organismos diferentes proporcionam enzimas de glicosilação diferentes

(glicosiltransferases e glicosidases) e substratos glicosilo diferentes, de modo que a composição final de uma cadeia lateral de açúcar pode variar bastante conforme o hospedeiro.

Por exemplo, microorganismos, tal como fungos filamentosos e leveduras (eucariotas inferiores) adicionam tipicamente mais manose e/ou açúcares fosfato de manosilo. O glicano resultante é conhecido como um tipo "rico em manose" ou manano. Em contraste, em células animais, a cadeia lateral de oligossacarídeos nascente pode ser aparada para remover vários resíduos de manose e alongada com resíduos de açúcar adicionais, que não ocorrem tipicamente nos N-glicanos de eucariotas inferiores. Vide R.K. Bretthauer, et al. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 30, 193-200; W. Martinet, et al. *Biotechnology Letters*, 1998, 20, 1171-1177; S. Weikert, et al. *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 1116-1121; M. Malissard, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 267, 169-173; Jarvis, et al. 1998 Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system, *Current Opinion in Biotechnology*, 9:528-533; and M. Takeuchi, 1997 *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 1997, 9, S29-S35.

Os N-glicanos que são produzidos em seres humanos e em animais são vulgarmente designados como N-glicanos complexos. Um N-glicano complexo significa uma estrutura tipicamente com duas a seis ramificações laterais, com uma sequência sialilactosamina ligada a uma estrutura nuclear interna  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Um N-glicano complexo possui pelo menos uma ramificação e, preferencialmente, pelo menos duas ramificações de resíduos alternados de GlcNAc e galactose (Gal), terminados em oligossacarídeos, tal como, por

exemplo: NeuNAc-; NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-; NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-; NeuAc $\alpha$ 2-3/6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-; GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-(só mucinas); Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-(grupo sanguíneo H). Podem ocorrer ésteres sulfato em resíduos galactose, GalNAc e GlcNAc e podem ocorrer ésteres fosfato em resíduos manose. NeuAc (Neu: ácido neuramínico; Ac:acetilo) pode ser O-acetilado ou substituído por NeuGI (ácido N-glicolilneuramínico). Os N-glicanos complexos podem ter também substituições intracadeia de GlcNAc e fucose nuclear ("core") (Fuc).

A glicosilação humana tem início com um conjunto sequencial de reacções no retículo endoplasmático (RE) que conduz a uma estrutura de oligossacarídeo nuclear ("core"), que é transferida para proteínas sintetizadas *de novo* no resíduo asparagina, na sequência Asn-Xaa-Ser/Thr (ver figura 1A). A continuação do processamento, por meio de glucosidases e manosidases tem lugar no RE antes da transferência da glicoproteína nascente para o aparelho de Golgi cis, no qual são removidos resíduos adicionais de manose por meio de 1,2-manosidases específicas de Golgi. O processamento continua à medida que as proteínas avançam através do aparelho de Golgi. No Golgi mediano, várias enzimas modificadoras, incluindo N-acetilglucosamina transferases (GnT I, GnT II, GnT III, GnT IV, GnT V, GnT VI), manosidase II, fucosiltransferases adicionam e removem resíduos de açúcar específicos (consultar figura 1B). Finalmente, na rede trans de Golgi, os N-glicanos são afectados por galactosil transferases e sialiltransferases (ST) e a glicoproteína acabada é libertada do aparelho de Golgi. A proteína N-glicano de glicoproteínas animais possui estruturas bi, tri ou tetra-antenas e, tipicamente, pode

incluir galactose, fucose e N-acetilglucosamina. Vulgarmente, os resíduos terminais dos N-glicanos consistem em ácido siálico. Uma estrutura típica de um N-glicano humano é apresentada na figura 1B.

#### Precursores de Nucleotídeos de Açúcar

Os N-glicanos de glicoproteínas animais incluem tipicamente galactose, frutose e ácido siálico terminal. Estes açúcares não são normalmente encontrados em glicoproteínas produzidas em leveduras e fungos filamentosos. Em seres humanos, a totalidade da gama de precursores de nucleotídeos de açúcar (por exemplo, UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, ácido CMP-N-acetilneuramínico, UDP-galactose, GDP-fucose, etc.) são geralmente sintetizados no citosol e transportados para o Golgi, onde são ligados ao oligossacarídeo nuclear pelas glicosiltransferases. (Sommers e Hirschberg, 1981 J. Cell Biol. 91 (2): A406-A406; Sommers e Hirschberg 1982 J. Biol. Chem. 257(18): 811-817; Perez e Hirschberg 1987 Methods in Enzymology 138: 709-715).

As reacções de transferência do glicosilo rendem tipicamente um subproduto, que é um nucleosídeo difosfato ou monofosfato. Enquanto os monofosfatos podem ser directamente exportados, em troca de açúcares trifosfato nucleosídeo por um mecanismo antiporta, os difosfonucleosídeos (por exemplo GDP) têm de ser clivados por fosfatases (por exemplo GDPase) para se obter nucleosídeos monofosfatos e fosfatos inorgânicos antes de serem exportados. Esta reacção é importante para uma glicosilação eficiente, por exemplo, constatou-se que a

GDPase de *S.cerevisiae* é necessária para a manosiilação. No entanto, a GDPase têm uma actividade reduzida em 90 % em relação à UDP (Berninsone et al., 1994 J. Biol. Chem. 269(1):207-211α). Tipicamente, as células eucariotas inferiores não têm actividade difosfatase específica de UDP no Golgi, uma vez que não utilizam precursores açúcar-UDP para a síntese de glicoproteínas nos Golgi. Constatou-se que a *Schizosaccharomyces pombe*, uma levedura que se verificou adicionar resíduos de galactose aos polissacarídeos da membrana celular (da UDP-galactose), tem actividade UDPase específica, indicando a necessidade de uma enzima destas (Berninsone et al., 1994). A UDP é conhecida como um potente inibidor das glicosiltransferases e a remoção deste subproduto da glicosilação é importante para prevenir a inibição da glicosiltransferase no lúmen do Golgi (Khatara et al., 1974). Vide Berninsone, P., et al 1995. J. Biol. Chem. 270(24): 14564-14567; Beaudet, L., et al 1998 Abc Transporters: Biochemical, Cellular, and Molecular Aspects. 292:397-413.

#### Compartimentação De Enzimas De Glicosilação

As glicosiltransferases e manosidases cobrem a superfície interna (luminal) do RE e aparelho de Golgi, proporcionando assim uma superfície catalítica que permite o processamento sequencial de glicoproteínas à medida que progridem através do RE e rede de Golgi. As múltiplas cisternas do Golgi cis, mediano e trans e a rede Golgi trans (trans Golgi Network - TGN) proporcionam as diferentes localizações onde pode ocorrer a sequência ordenada das reacções de glicosilação. À medida que uma glicoproteína progride da síntese no RE

até à maturação completa no Golgi trans ou TGN é sequencialmente exposta a várias glicosidases, manosidases e glicosiltransferases, de modo que pode ser sintetizada uma estrutura N-glicano específica. Tipicamente, as enzimas incluem um domínio catalítico, uma região tronco, uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática N-terminal. Estes três últimos componentes estruturais são responsáveis pela orientação de uma enzima de glicosilação para o *locus* apropriado.

As sequências de localização de um organismo podem funcionar noutros organismos. Por exemplo, revelou-se que a região transmembranar de  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase ( $\alpha$ -2,6-ST) de ratos, uma enzima conhecida por localizar no Golgi trans de rato, localiza também um gene repórter (invertase) no Golgi de levedura (Schwientek, et al., 1995). No entanto, precisamente a mesma região transmembranar, como parte de  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase completa, foi retida no RE e não continuou a ser transportada para o Golgi da levedura (Krezdom et al., 1994). Um GaIT completo de seres humanos nem sequer foi sintetizado em levedura, apesar dos elevados níveis de transcrição demonstráveis. Por outro lado, a região transmembranar do mesmo GaIT humano fundido com um gene repórter da invertase foi capaz de direccionar a localização para o Golgi de levedura, muito embora a níveis de produção muito baixos. Schwientek e colaboradores revelaram que a fusão de 28 aminoácidos de uma manosiltransferase (Mnt1) de levedura, uma região contendo uma cauda citoplasmática N-terminal, uma região transmembranar e oito aminoácidos da região tronco para o domínio catalítico de GaIT humano bastam para a localização Golgi de um GaIT activo (Schwientek et al. 1995 J. Biol.



Chem. 270(10):5483-5489). Outras galactosiltransferases dependem aparentemente de interacções com enzimas residentes em organelos específicos, uma vez que após a remoção da respectiva região transmembranar ainda são capazes de localizar adequadamente.

Uma localização incorrecta de uma enzima de glicosilação pode impedir um adequado funcionamento da enzima na via. Por exemplo, *Aspergillus nidulans*, que possui numerosas  $\alpha$ -1,2-manosidasases (Eades e Hintz, 2000 Gene 255(1): 25-34), não acrescenta GlcNAc a MansGlcNAc<sub>2</sub> quando é transformado com o gene GnT I de coelho, apesar de um elevado nível geral de actividade GaT I (Kalsner et al., 1995). GnT I, embora expresso activamente, pode ser incorrectamente localizado, de modo que a enzima não fica em contacto com os seus dois substratos: O N-glicano nascente da glicoproteína e UDP-GlcNAc. Em alternativa, o organismo hospedeiro pode não proporcionar um nível adequado de UDP-GlcNAc no Golgi.

#### Glicoproteínas Utilizadas Terapeuticamente

Uma fracção significativa de proteínas isoladas a partir de seres humanos ou outros animais são glicosiladas. Entre as proteínas utilizadas terapeuticamente, cerca de 70 % são glicosiladas. No entanto, se uma proteína terapêutica é produzida num hospedeiro microrganismo, tal como levedura, e é glicosilada utilizando a via endógena, a sua eficiência terapêutica é, tipicamente, muito reduzida. Estas glicoproteínas são tipicamente imunogénicas em seres humanos e revelam um reduzido tempo de vida útil *in vivo* após a administração (Takeuchi, 1997).

Receptores específicos em seres humanos e animais podem reconhecer resíduos terminais de manose e promover uma rápida eliminação da proteína da corrente sanguínea. Outros efeitos adversos adicionais podem incluir alterações no enrolamento da proteína, sua solubilidade, susceptibilidade a proteases, tráfico, transporte, compartimentação, secreção, reconhecimento por outras proteínas ou factores, antigenicidade ou alergenicidade. Assim, tem sido necessário produzir glicoproteínas terapêuticas em sistemas hospedeiros animais, de modo que o padrão de glicosilação seja idêntico ou pelo menos semelhante ao de seres humanos ou da espécie receptora pretendida. Na maioria dos casos é utilizado um sistema hospedeiro mamífero, tal como uma cultura de células de mamífero.

#### Sistemas Para A Produção De Glicoproteínas Terapêuticas

Para produzir proteínas terapêuticas que tenham glicoformas apropriadas e tenham efeitos terapêuticos satisfatórios têm sido utilizados sistemas de expressão à base de animais ou plantas. Os sistemas disponíveis incluem:

1. Células do ovário de hamster chinês (chinese hamster ovary cells-CHO), células de fibroblasto de ratinho e células de mieloma de ratinho (Arzneimittelforschung. 1998 Aug;48(8):870-880);
2. Animais transgênicos, tais como cabras, carneiros, ratinhos e outros (Dente Prog. Clin. BioL 1989 Res. 300:85-98, Ruther et al., 1988 Cell 53(6):847-856; Ware, J., et al. 1993 Thrombosis and Haemostasis 69(6): 1194-1194; Cole, E. S., et al. 1994 J. Cell. Biochem 265-265);

3. plantas (*Arabidopsis thaliana*, tabaco, etc.) (Staub, et al. 2000 Nature Biotechnology 18(3): 333-338) (McGarvey, P. B., et al. 1995 Bio-Technology 13(13): 1484-1487; Bardor, M., et al. 1999 Trends in Plant Science 4(9): 376-380);
4. Células de insectos (*Spodoptera frugiperda* Sf9, Sf21, *Trichoplusia ni*, etc. em combinação com baculovírus recombinantes, tais como *Autographa californica*, vírus da poliedrose nuclear múltiplos que infectam células de lepidóptero) (Altmans et al., 1999 Glycoconj. J. 16(2): 109-123).

Proteínas humanas recombinantes expressas nos sistemas hospedeiros anteriormente mencionados podem ainda incluir glicoformas não-humanas (Raju et al., 2000 Annals Biochem. 283(2):123-132). Em particular, pode faltar ácido siálico terminal, tipicamente encontrado em glicoproteínas humanas, à fracção do N-glicano. Têm sido dirigidos esforços substanciais para processos de desenvolvimento, a fim de obter glicoproteínas tão próximas quanto possível, quanto à estrutura, às formas humanas ou tenham outras vantagens terapêuticas. As glicoproteínas com glicoformas específicas podem ser especialmente úteis, por exemplo no endereçamento de proteínas terapêuticas. Por exemplo, a adição de um ou mais resíduos de ácido siálico à cadeia lateral glicano pode aumentar o tempo de vida de uma glicoproteína terapêutica *in vivo* após a administração. Assim, as células hospedeiras de mamífero podem ser geneticamente manipuladas de modo a aumentar a extensão do ácido siálico terminal em glicoproteínas expressas nas células. Em alternativa, o ácido siálico pode ser conjugado com a proteína de interesse *in vitro* antes da administração, recorrendo a uma

transferase de ácido siálico e um substrato apropriado. Além disso, têm sido empregues alterações na composição do meio de crescimento ou na expressão das enzimas envolvidas na glicosilação humana para produzir glicoproteínas mais semelhantes às formas humanas (S. Weikert, et al, Nature Biotechnology, 1999, 17,1116-1121; Werner, Noe, et al 1998 Arzneimittelforschung 48(8):870-880; Weikert, Papac et al., 1999; Andersen e Goochee 1994 Cur. Opin.Biotechnol. 5: 546-549; Yang e Butler 2000 Biotechnol. Bioengin 68(4): 370-380). Em alternativa podem ser utilizadas células humanas cultivadas.

No entanto, todos os sistemas existentes têm desvantagens significativas. Só algumas proteínas terapêuticas são adequadas para a expressão em sistemas animais ou vegetais (por exemplo, aquelas sem qualquer efeito citotóxico ou outro efeito negativo para o crescimento). Sistemas de cultura celular animais e vegetais são normalmente muito lentos, exigindo frequentemente mais de uma semana de crescimento em condições cuidadosamente controladas para produzir qualquer quantidade útil da proteína de interesse. Contudo, os rendimentos proteicos têm resultados desfavoráveis em comparação com os dos processos de fermentação microbiana. Para além disso, os sistemas de cultura celular exigem tipicamente nutrientes complexos e dispendiosos, bem como cofactores, tais como soro fetal de bovino. Além disso, o crescimento pode ser limitado pela morte celular programada (apoptose).

E ainda, as células animais (particularmente as células de mamífero) são muito susceptíveis a infecções virais ou contaminação. Nalguns casos o vírus ou outro agente infeccioso pode comprometer o crescimento da cultura,

enquanto que noutros casos o agente pode ser um agente patogénico humano, tornando o produto proteico terapêutico impróprio para o fim previsto. Muitos processos de cultura celular exigem a utilização de componentes do meio de crescimento complexos, termicamente sensíveis, derivados de animais, os quais podem transportar agentes patogénicos, tais como priões de encefalopatia espongiforme bovina (BSE). Estes agentes patogénicos são difíceis de detectar e/ou difíceis de remover ou esterilizar sem comprometer o meio de crescimento. Em qualquer caso, a utilização de células de animais para produzir proteínas terapêuticas necessita de dispendiosos controlos de qualidade para garantir a segurança do produto.

Podem também ser utilizados animais transgénicos para o fabrico de grandes volumes de proteínas terapêuticas, tais como de albumina de soro humano, activador do plasminogénio de tecido, hemoglobina de anticorpos monoclonais, colagénio, fibrinogénio e outros. Enquanto que as cabras transgénicas e outros animais transgénicos (ratinhos, ovelhas, vacas, etc.) podem ser geneticamente manipulados para produzir proteínas terapêuticas em grandes concentrações no leite, o processo é dispendioso, uma vez que cada lote tem de ser submetido a rigorosos controlos de qualidade. Os animais podem ser hospedeiros de uma variedade de agentes patogénicos animais ou humanos, incluindo bactérias, vírus, fungos e priões. No caso do tremor epizoótico e encefalopatia espongiforme bovina, as análises podem levar cerca de um ano para despistar a infecção. A produção de compostos terapêuticos é assim executada preferencialmente em ambiente estéril bem controlado, por exemplo nas condições defendidas pelas Boas

Práticas de Fabrico (BPF). No entanto, geralmente não é praticável a manutenção de animais nestes ambientes. Além disso, enquanto as células desenvolvidas num fermentador são derivadas de um Banco de Células Principal (BCP) bem caracterizado, a tecnologia de animais transgénicos depende de diferentes animais e é, assim, inerentemente não uniforme. Além disso, factores externos, tais como diferenças no consumo de alimento, doenças e falta de homogeneidade no seio da manada, podem afectar os padrões de glicosilação do produto final. Sabe-se que em seres humanos, por exemplo, diferentes hábitos alimentares têm como resultado diferentes padrões de glicosilação. Têm sido empregues plantas transgénicas como fonte potencial para obter proteínas de valor terapêutico. No entanto, um elevado nível de expressão de proteínas em plantas sofre de silenciamento genético, um mecanismo por meio do qual os genes de proteínas muito expressas sofrem uma subregulação nas gerações seguintes das plantas. Além disso, as plantas adicionam xilose e/ou fucose com ligação  $\alpha$ -1,3 a N-glicanos da proteína, resultando em glicoproteínas que diferem estruturalmente dos animais e são imunogénicas em mamíferos (Altmann, Marz et al, 1995 Glycoconj. J. 12(2);150-155). Para além disso, em geral não é prático desenvolver plantas em ambiente estéril ou BPF e a recuperação de proteínas a partir de tecidos vegetais é mais cara do que a recuperação a partir de microrganismos fermentados.

Produção De Glicoproteína Utilizando Microrganismos Eucariotas

A falta de um sistema de expressão adequado constitui assim um obstáculo significativo à produção económica e segura de glicoproteínas humanas recombinantes. A produção de glicoproteínas através da fermentação de microrganismos viria a oferecer numerosas vantagens em relação aos sistemas existentes. Por exemplo, processos à base de fermentação poderão oferecer (a) rápida produção de grandes concentrações de proteína; (b) a capacidade de utilização de condições de produção estéreis, bem controladas (por exemplo condições BPF); (c) a capacidade de utilização de meios de crescimento simples, definidos quimicamente; (d) facilidade de manipulação genética; (e) ausência de agentes patogénicos contaminantes humanos ou animais; (f) capacidade de expressar uma grande variedade de proteínas, incluindo aquelas de fraca expressão em cultura celular devido a toxicidade, etc.; (g) facilidade de recuperação das proteínas (por exemplo via secreção para o meio). Além disso, a construção das unidades de fermentação é normalmente muito menos dispendiosa do que a das unidades de cultura celular.

Como apontado anteriormente, porém, as bactérias, incluindo as espécies tais como *Escherichia coli*, vulgarmente utilizadas na produção de proteínas recombinantes, não glicosilam proteínas de uma forma específica como as células eucariotas. Várias leveduras metilotróficas, tal como *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* e *Hansenula polymorpha* são particularmente úteis como sistemas de expressão eucariotas uma vez que são capazes de crescer até atingir elevadas densidades de células e/ou segregar grandes quantidades de proteína recombinante. No entanto, como indicado anteriormente, as glicoproteínas expressas

nestes microrganismos eucariotas diferem substancialmente quanto à estrutura N-glicano daquelas que se encontram em animais. Este facto tem impedido a utilização de levedura ou fungos filamentosos como hospedeiros para a produção de muitas glicoproteínas úteis.

Têm sido envidados vários esforços para modificar as vias de glicosilação de microrganismos eucariotas para proporcionar glicoproteínas mais adequadas ao uso como agentes terapêuticos para mamíferos. Por exemplo, têm sido clonadas em separado várias glicosiltransferases e expressas em *S. cerevisiae* (GAIT, GnT I), *Aspergillus nidulans* (GnT I) e outros fungos (Yoshida et al., 1999, Kalsner et al., 1995 Glycoconj. J. 12(3):360-370, Schwientek et al., 1995). No entanto, não foram obtidos N-glicanos com características humanas.

As leveduras produzem uma variedade de manosiltransferases por exemplo 1,3-manosiltransferases (por exemplo MNN 1 em *S. cerevisiae*) (Graham e Emr, 1991 J. Cell. Biol. 114(2):207-218), 1,2-manosiltransferases (por exemplo família KTR/KRE de *S. cerevisiae*), 1,6-manosiltransferases (OCH1 de *cerevisiae*), manosilfosfato transferases (MNN4 e MNN6 e *S. cerevisiae*) e enzimas adicionais que estão envolvidas em reacções de glicosilação endógenas. Muitos destes genes foram eliminados individualmente, dando origem a organismos viáveis com perfis de glicosilação alterados. São apresentados exemplos no quadro 1.

Quadro 1 Exemplos de estirpes de levedura com manosilação alterada

Estirpe	N-glicano (tipo	Mutação	N-glicano (mutante)	Referência
---------	-----------------	---------	---------------------	------------



	selvagem)			
<i>S. pombe</i>	Man <sub>&gt;9</sub> GlcNA C <sub>2</sub>	OCH1	Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	Yoko-o et al., 2001 FEBS Lett. 489(1):75-80
<i>S. cerevisiae</i>	Man <sub>&gt;9</sub> GlcNA C <sub>2</sub>	OCH1/MNN1	Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	Nakanishi-Shindo et al., 1993 J. Biol. Chem. 268(35):26338-26345
<i>S. cerevisiae</i>	Man <sub>&gt;9</sub> GlcNA C <sub>2</sub>	OCH1/MNN1/MN N4	Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub> ,	Chiba et al., 1998 J. Biol. Chem. 273, 26298-26304

Além disso, a publicação do pedido de patente japonesa nº 8-336387 revela uma estirpe mutante OCH1 de *Pichia pastoris*. O gene OCH1 codifica 1,6-manosiltransferase, que adiciona uma manose à estrutura glicano Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> para se obter Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. A estrutura Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> é, então, um substrato para posterior manosição *in vivo*, conduzindo às glicoproteínas hipermanosiladas, que são características das leveduras e podem ter tipicamente pelo menos 30-40 de resíduo manose por N-glicano. Na estirpe mutante OCH1, as proteínas glicosiladas com Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> são acumuladas e a hipermanosição não tem lugar. Porém, a estrutura Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> não é um substrato para as enzimas de glicosilação animal, tal como UDP-GlcNAc transferase I humana e, assim, o método não é útil para a produção de proteínas com padrões de glicosilação humanos.

Martinet et al. (Biotechnol. Lett. 1998, 20(12), 1171-1177) divulgou a expressão de  $\alpha$ -1,2-manosidase de *Trichoderma reesei* em *P. pastoris*. Foi observado algum encurtamento da

manose a partir dos N-glicanos de uma proteína modelo. Contudo, a proteína modelo não tinha N-glicanos com a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , a qual seria necessária como intermediário para a geração de N-glicanos complexos. Assim, o método não é útil para a produção de proteínas com padrões de glicosilação humanos ou animais.

De modo semelhante Chiba et al. 1998 expressou  $\alpha$ -1,2-manosidase a partir de *Aspergillus saitoi* na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Uma sequência de peptídeo de sinal (His-Asp-Glu-Leu) foi manipulada, sendo transformada na manosidase exógena para promover retenção no retículo endoplasmático. Além disso, o hospedeiro da levedura tem um mutante sem três actividades enzimáticas associado a hipermanosilação de proteínas: 1,6-manosiltransferase (OCH1); 1,3-manosiltransferase (MN1) e manosilfosfatotransferase (MN4). Os N-glicanos do hospedeiro mutante triplo consistiam assim na estrutura  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , em vez das formas com elevado teor de manose encontradas em *S. cerevisiae* do tipo selvagem. Na presença de da manosidase fortemente expressa, os N-glicanos de uma proteína modelo (carboxipeptidase Y) foram encurtados para proporcionar uma mistura constituída por 27 % em mole de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , 22 % em mole de  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ , 22 % em mole de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ , 29 % em mole de  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . O encurtamento das glicoproteínas da membrana celular enxógena foi menos eficiente, apenas 10 % em mole dos N-glicanos com a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  desejada. O trabalho de Chiba encontra-se também descrito na EP-A1 1 211 311. Apesar de Chiba ter expresso em grande número de cópias uma quantidade mais que saturante da sua manosidase e ter obtido rendimentos relativamente fracos, sugeriu a

expressão de ainda mais enzimas para resolver o problema dos fracos rendimentos. Chiba nunca sugere que a enzima a ser direccionada deve ser escolhida por trabalhar de modo óptimo na célula hospedeira seleccionada, na localização subcelular onde é suposto converter o respectivo substrato. Uma vez que só os glicanos  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  seriam susceptíveis de prosseguir com a conversão enzimática em glicoformas humanas, o método não é eficiente para a produção de proteínas com padrões de glicosilação humanos. Em proteínas com um único local de N-glicosilação, pelo menos 73 % em mole teria uma estrutura incorrecta. Em proteínas com dois ou três locais de N-glicosilação, respectivamente pelo menos 93 ou 98 % em mole teria uma estrutura incorrecta. Eficiências de conversão tão baixas não são satisfatórias para a produção de agentes terapêuticos, particularmente porque a separação de proteínas com glicoformas diferentes é tipicamente cara e difícil.

Com o objectivo de proporcionar uma glicoproteína mais semelhante à glicoproteína do ser humano derivada de um hospedeiro fúngico, a patente norte-americana nº 5,834,251 de Maras e Contreras revela um método para a produção de uma glicoproteína híbrida, derivada de *Trichoderma reesei*. Um N-glicano híbrido só tem resíduos de manose no braço mana 1-6 do núcleo e uma ou duas antenas complexas no braço mana 1-3. Embora esta estrutura tenha utilidade, o método tem a desvantagem da necessidade de execução de numerosas etapas enzimáticas *in vitro*, o que é dispendioso e moroso. As enzimas isoladas são caras de preparar e manter, podem necessitar de substratos invulgares e dispendiosos (por exemplo UDP-GlcNAc) e tendem a perder a efeito actividade proteólise nas condições de uso.

Por conseguinte, um objectivo da presente invenção consiste em proporcionar um sistema e métodos de humanização da glicosilação de glicoproteínas recombinantes expressas em *Pichia pastoris* e outras células eucariotas inferiores, tais como *Hansenula polymorpha*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp*, *Kluyveromyces sp*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* e *Trichoderma reseei*.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

Foram desenvolvidas linhas de células com vias de glicosilação geneticamente modificadas, que lhes permitem executar uma sequência de reacções enzimáticas, as quais mimetizam o processamento de glicoproteínas em seres humanos. As proteínas recombinantes expressas nestes hospedeiros modificados fornecem glicoproteínas mais semelhantes, quando não substancialmente idênticas, às suas equivalentes humanas. As células eucariotas inferiores, que normalmente produzem N-glicanos com elevado teor de manose, incluindo fungos unicelulares e multicelulares, tais como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* e *Trichoderma reseei* são modificadas de forma a produzirem N-glicanos tais como  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  ou outras estruturas pelas vias de glicosilação do ser humano. Este objectivo é atingido recorrendo à combinação de engenharia e/ou selecção de estirpes que: não expressam certas enzimas que criam as estruturas complexas indesejáveis características das glicoproteínas fúngicas, as quais expressam enzimas exógenas seleccionadas por terem uma actividade óptima nas condições presentes nos fungos

onde a actividade é desejada ou por serem direccionadas para um organelo onde é alcançada a actividade óptima, e combinações destas em que a célula eucariota geneticamente modificada expressa múltiplas enzimas exógenas, necessárias para a produção de glicoproteínas "semelhantes às do ser humano".

Numa primeira forma de realização, a presente invenção refere-se a um método de rastreio de uma biblioteca para uma célula hospedeira capaz de produzir uma glicoproteína alvo com um excesso de 30 % em mole de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , compreendendo o método mencionado as seguintes etapas:

- (a) fornecimento de uma célula hospedeira unicelular ou fúngica filamentosa, que não apresente actividade alfa-1,6-manosiltransferase no que se refere ao N-glicano na glicoproteína alvo;
- (b) introdução de um gene na célula hospedeira mencionada, gene esse que codifica uma enzima híbrida compreendendo um domínio catalítico alfa-1,2-manosidase fundido a um peptídeo de sinal N-terminal celular que está direccionado e ancora o domínio catalítico mencionado ao RE ou aparelho de Golgi e
- (c) determinação do nível de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  na proteína alvo.

De resto, a presente invenção refere-se a uma célula hospedeira que pode ser obtida por meio de métodos da presente invenção. Deste modo, a presente invenção refere-se a um microrganismo que é modificado para expressar uma enzima  $\alpha$ -1,2 manosidase exógena, preferencialmente com um pH óptimo entre 5,1 e 8,0, de preferência entre 5,9 e 7,5. Nesta conformidade, a enzima exógena é endereçada para o

retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi do organismo hospedeiro, onde encurta N-glicanos tal como  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  para se obter  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Esta última estrutura é útil porque é idêntica a uma estrutura formada em mamíferos, especialmente me seres humanos, é um substrato para outras reacções de glicosilação *in vivo* e/ou *in vitro* que produzem um N-glicano acabado, semelhante ou idêntico ao formado em mamíferos, em especial seres humanos e não é um substrato para reacções de hipermanosilação, que ocorrem *in vivo* na levedura e outros microrganismos e que tornam uma glicoproteína altamente imunogénica em animais.

Numa segunda forma de realização, a presente invenção refere-se a uma célula hospedeira que é um fungo unicelular ou filamentoso que:

(a) não revela actividade alfa-1,6 manosiltransferase no que se refere ao N-glicano numa glicoproteína e

(b) possui no seu retículo endoplasmático (RE) ou aparelho de Golgi uma enzima híbrida seleccionada por ter uma actividade óptima no RE ou Golgi, compreendendo:

(ba) um domínio catalítico alfa-1,2 manosidase fundido a

(bb) um peptídeo de sinal quimérico, de endereçamento N-terminal, celular, para o domínio catalítico de (ba) que está orientado para e ancora o domínio catalítico de (ba) ao RE ou aparelho de Golgi mencionado.

A célula hospedeira mencionada ainda

(c) possui no seu RE ou aparelho de Golgi uma enzima híbrida seleccionada por ter uma actividade óptima no RE ou Golgi, compreendendo:

(can) um domínio catalítico GnT I fundido a

(cb) um peptídeo de sinal quimérico, de endereçamento N-terminal, celular para o domínio catalítico de (ca) que está orientado para e ancora o domínio catalítico de (ca) ao RE ou Golgi mencionado.

Nesta conformidade, a via de glicosilação de um microrganismo eucariota é modificada por (a) construção de uma biblioteca de ADN incluindo pelo menos dois genes codificadores de enzimas de glicosilação exógenas; (b) transformação do microrganismo com a biblioteca para produzir uma população geneticamente mista, a exprimir pelo menos duas enzimas de glicosilação exógena distintas; (c) selecção da população de um microrganismo com o fenotipo de glicosilação desejado. De preferência, a biblioteca de ADN inclui genes quiméricos, codificando cada um uma sequência de localização de proteína e uma actividade catalítica relacionada com a glicosilação. Os organismos modificados com o método são úteis para a produção de glicoproteína com um padrão de glicosilação semelhante ou idêntico ao dos mamíferos, em especial seres humanos.

Numa terceira forma de realização, a presente invenção refere-se a um método de produção de uma glicoproteína recombinante compreendendo (a) a introdução de um ácido nucleico codificador da glicoproteína recombinante numa célula hospedeira da presente invenção; (b) expressão do ácido nucleico numa célula hospedeira para produzir a

glicoproteína e (c) isolamento da glicoproteína recombinante a partir da célula hospedeira. Numa outra forma de realização, a via de glicosilação é modificada de forma a exprimir uma enzima transportadora do nucleótido açúcar. Numa forma de realização preferida é também expressa uma enzima nucleotídeo difosfatase. A enzima transportadora e difosfatase é também expressa. A enzima transportadora e difosfatase melhoram a eficiência das etapas de glicosilação modificadas ao proporcionar os compartimentos adequados, reduzir a inibição competitiva do produto e promover a remoção de nucleosídeos difosfatos.

#### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1A é um diagrama esquemático de uma via de N-glicosilação fúngica típica.

A figura 1B é um diagrama esquemático de uma via de N-glicosilação humana típica.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os métodos e estirpes de eucariotas inferiores recombinantes presentemente descritos são utilizados para fazer "glicoproteínas humanizadas". As células eucariotas inferiores recombinantes são feitas por meio de modificação das células eucariotas inferiores que não exprimem uma ou mais enzimas envolvidas na produção de estruturas com elevado teor de manose, para exprimir as enzimas necessárias para a produção de açúcares semelhantes aos humanos. Tal como presentemente utilizado, uma célula eucariota inferior é fungo unicelular ou filamentoso. Tal



como presentemente utilizado, uma "glicoproteína humanizada" refere-se a uma proteína com N-glicanos ligados, incluindo menos do que quatro resíduos manose e os intermediários sintéticos "que são também úteis e podem ser ainda mais manipulados *in vitro*) com pelo menos cinco resíduos manose. Numa forma de realização preferida, as glicoproteínas produzidas nas estirpes eucariotas inferiores recombinantes contêm pelo menos 27 % em mole do intermediário Man5. Este alvo é atingido por meio da clonagem numa manosidase melhor, isto é, uma enzima seleccionada por ter uma actividade óptima nas condições presentes no organismo, no local onde as proteínas são glicosiladas, ou por meio de endereçamento da enzima para o organelo onde a actividade é desejada.

Numa forma de realização preferida são utilizadas as estirpes eucariotas que não exprimem uma ou mais enzimas envolvidas na produção de estruturas com elevado teor de manose. Estas estirpes podem ser modificadas ou podem ser um dos muitos mutantes já descritos nas leveduras, incluindo um mutante hipermanosilação (OCH1) em *Pichia pastoris*.

As estirpes podem ser modificadas uma enzima de cada vez ou então pode ser criada uma biblioteca de genes codificadores de enzimas potencialmente úteis e seleccionadas as estirpes com enzimas possuidoras de actividades óptimas ou produtoras das glicoproteínas mais "semelhantes às do ser humano".

As células eucariotas inferiores que são capazes de produzir glicoproteínas com o N-glicano Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ligado são particularmente úteis uma vez que (a) lhes falta um

elevado grau de manosilação (por exemplo maior que 8 manoses por N-glicano ou especialmente 30 a 40 manoses) revelam uma imunogenicidade reduzida nos seres humanos e (b) o N-glicano é um substrato para mais reacções de glicosilação formarem uma glicoforma ainda mais semelhante à do ser humano, por exemplo por meio da acção de GlcNAc transferase I para formar GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> deve ser formado *in vivo* com um elevado rendimento, pelo menos transitoriamente, uma vez que todas as reacções de glicosilação subsequentes exigem Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ou seus derivados. Nesta conformidade é obtido um rendimento superior a 27 % em mole, mais preferencialmente um rendimento de 50-100 % em mole de glicoproteínas, nas quais uma elevada proporção de N-glicanos possuem Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. É então possível realizar mais reacções de glicosilação *in vitro*, utilizando por exemplo o método da patente norte-americana no 5 834 251 de Maras e Contreras. Numa forma de realização preferida, é realizada pelo menos mais uma reacção de glicosilação *in vivo*. Numa forma de realização muito preferida são expressas formas activas de enzimas de glicosilação no retículo endoplasmático e/ou aparelho de Golgi.

#### Microrganismos Hospedeiros

Tanto as leveduras como os fungos filamentosos têm sido empregues com êxito na produção de proteínas recombinantes (Cereghino, J. L. and J. M. Cregg 2000 FEMS Microbiology Reviews 24(1): 45-66; Harkki, A., et al. 1989 Bio-Technology 7(6): 596; Berka, R M., et al. 1992 Abstr.Papers

Amer. Chem.Soc.203: 121-BIOT; Svetina, M., et al. 2000 J.Biotechnol. 76(2-3): 245-251.

Embora a glicosilação em levedura e fungos seja muito diferente da glicosilação em seres humanos, partilham alguns elementos comuns. A primeira etapa, a transferência da estrutura oligossacarídeo nuclear para a proteína nascente, está muito conservada em todos os eucariotas, incluindo levedura, fungos, plantas e seres humano (compare as figuras 1A e 1B). O processamento subsequente dos oligossacarídeos nucleares difere contudo significativamente na levedura e envolve a adição de vários açúcares manose. Esta etapa é catalisada por manosiltransferases existentes no aparelho de Golgi (por exemplo, OCH1, MNT1, MNN1, etc.), que adicionam sequencialmente açúcares manose ao oligossacarídeo nuclear. A estrutura resultante é indesejada para a produção de proteínas humanóides e é, assim, desejável reduzir ou eliminar a actividade manosiltransferase. Os mutantes de *S. cerevisiae*, deficiente em actividade manosiltransferase (por exemplo mutantes och1 ou mnn9) revelaram que não são letais e apresentam um teor de manose reduzido no oligossacarídeo das glicoproteínas de levedura. Outras enzimas processadoras de oligossacarídeos, tal como manosilfosfato transferase, podem também ter de ser eliminadas conforme o padrão de glicosilação endógeno particular do hospedeiro. Após a redução de reacções de glicosilação endógenas indesejadas, a sanção de N-glicanos complexos tem de ser alterada no sistema hospedeiro. Este facto exige a expressão estável de várias enzimas e transportadores açúcar-nucleotídeo. De resto, um tem de

localizar estas enzimas de modo a garantir um processamento sequencial da estrutura de glicosilação em maturação.

### Glicoproteínas Alvo

Os métodos descritos presentemente são úteis para a produção de glicoproteínas, em especial glicoproteínas utilizadas a título terapêutico em seres humanos. Estas proteínas terapêuticas são tipicamente administradas por meio de injeção, por via oral, pulmonar ou outras vias. Exemplos de glicoproteínas-alvo adequadas incluem, sem constituir limitação: Eritropoietina, citoquinas tais como interferão- $\alpha$ , interferão- $\beta$ , interferão- $\gamma$ , interferão- $\omega$  e granulocito-CSF, factores de coagulação tais como factor VIII, factor IX e proteína humana C, cadeia  $\alpha$  do receptor IgE solúvel. IgG, IgM, uroquinase, quimase e inibidor da tripsina ureia, proteína de ligação IGF, factor de crescimento da epiderme, factor de libertação da hormona de crescimento, proteína de fusão de anexina V, angiostatina, factor-2 de crescimento endotelial vascular, factor-1 inibidor do progenitor mielóide e osteoprotegerina.

Método Para A Produção De Glicoproteínas Com O N-Glicano  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ .

A primeira etapa envolve a selecção ou criação de um eucariota inferior capaz de produzir uma estrutura precursora específica de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , que é capaz de aceitar GlcNAc *in vivo* por meio da acção de transferase I GlcNAc. Esta etapa exige a formação de uma estrutura isomérica específica de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Esta estrutura tem de

ser formada dentro da célula com um elevado rendimento (num excesso de 30 %), uma vez que todas as manipulações subsequentes são dependentes da presença deste precursor. As estruturas  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  são necessárias para a formação de N-glicano complexo, no entanto a sua presença não é suficiente, uma vez que  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  pode ocorrer em diferentes formas isoméricas, o que pode ou não servir como substrato para transferase L GlcNAc. A maioria das reacções de glicosilação não estão completas e, assim, uma proteína mais específica contém geralmente uma gama de estruturas hidrato de carbono diferentes (isto é glicoformas) à sua superfície. A mera presença de quantidades vestigiais (inferiores a 5 %) de uma estrutura particular, como  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , reveste-se de pouca relevância prática. Exige-se sim a formação de um intermediário aceitador de transferase I GlcNAc (estrutura I) com elevado rendimento (acima de 30 %). A formação deste intermediário é necessária e permite depois a síntese *in vivo* de N-glicanos complexos.

Pode-se seleccionar estes eucariotas inferiores a partir de fungos naturais ou, em alternativa, geneticamente modificados ou outros eucariotas inferiores para proporcionar a estrutura *in vivo*. Nenhum eucariota inferior demonstrou proporcionar estas estruturas *in vivo* com um excesso de 1,8 % do total de N-glicanos (Maras et al., 1997), pelo que é preferido um organismo geneticamente modificado. Podem ser empregues métodos tais como os descritos na patente norte-americana 5,595,900 para identificar a ausência ou presença de glicosiltransferases, manosidases e transportadores de açúcar nucleotídeo específicos num organismo alvo de interesse.

## Inactivação De Enzimas De Glicosilação Fúngica, Tal Como 1,6-Manosiltransferase

O método presentemente descrito pode ser empregue para modificar o padrão de glicosilação de uma vasta gama de eucariotas inferiores (por exemplo, *Hansenula polymorpha*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp*, *Kluyveromyces sp*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, etc.). É utilizado *Pichia pastoris* para exemplificar as etapas de manipulação necessárias. À semelhança de outros eucariotas inferiores, o *P.pastoris* processa estruturas  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  no RE com um 1,2- $\alpha$ -manosidase para se obter  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . Por meio da acção de várias manosiltransferases, esta estrutura é depois convertida em estruturas hipermanosiladas ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), também conhecida como mananos. Além disso, constatou-se que *P.pastoris* é capaz de acrescentar grupos fosfato não-terminais por meio da acção das manosilfosfato transferases para a estrutura de hidrato de carbono. Este aspecto é contrário às reacções encontradas em células de mamífero, as quais envolvem a remoção de açúcares manose em vez da sua adição. Reveste-se de particular importância a eliminação da capacidade do fungo para hipermanosilar a estrutura  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  existente. Este facto pode ser alcançado por meio da selecção de um fungo que não procede à hipermanosilação ou um fungo geneticamente manipulado.

Os genes que estão envolvidos neste processo foram identificados no *Pichia pastoris* e, por meio da criação de mutações nestes genes, é possível reduzir a produção de glicoformas "indesejadas". Estes genes podem ser

identificados por homologia com manosiltransferases existentes (por exemplo, OCH1, MNN4, MNN6, MNN1), encontradas noutros eucariotas inferiores, tais como *C. albicans*, *Pichia angusta* ou *S.cerevisiae* ou por meio de mutagenização da estirpe hospedeira e selecção de um fenotipo com manosilação reduzida. Com base nas homologias entre as manosiltransferases e manosilfosfato transferases conhecidas, é possível conceber iniciadores para PCR, cujos exemplos se encontram no quadro 2, ou utilizar genes ou fragmentos de gene codificadores das enzimas como sondas para identificar homólogos em bibliotecas de ADN do organismo alvo. Em alternativa, é possível complementar fenotipos particulares em organismos relacionados. Por exemplo, para obter o gene ou genes codificadores da actividade 1,6-manosiltransferase em *P.pastoris*, é possível executar as seguintes etapas. Mutantes OCH1 de *S. cerevisiae* são termicamente sensíveis e crescem lentamente a temperaturas elevadas. Deste modo é possível identificar homólogos funcionais de OCH1 em *P.pastoris* complementando um mutante OCH1 de *S. cerevisiae* com uma biblioteca de ADN ou cADN de *P.pastoris*. Este mutantes de *S. cerevisiae* podem ser encontrados em <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/> e estão comercialmente disponíveis em <http://www.resgen.com/products/YFASTD.php3>. Os mutantes que apresentam um fenotipo de crescimento normal a temperatura elevada, após terem sido transformados com uma biblioteca de ADN de *P.pastoris* possuem muito provavelmente um homólogo OCH1 de *P.pastoris*. Uma biblioteca destas pode ser criada por meio de digestão parcial do ADN cromossómico de *P.pastoris* com uma enzima de restrição adequada e, após inactivação da enzima de

restrição, ligação do ADN digerido a um vector adequado, o qual foi previamente digerido com uma enzima de restrição compatível. Os vectores adequados são pRS314, um plasmídeo com baixo número de cópias (CEN6/ARS4) baseado em pBluescript contendo o marcador Trp1 (Sikorski, R. S., e Hieter, P., 1989, Genetics 122, pg 19-27) ou pFL44S, um plasmídeo com elevado número de cópias (211<sub>μ</sub>) plasmídeo baseado em pUC19 modificado, contendo o marcador URA3 (Bonneaud, N., et al., 1991, Yeast 7, pg. 609-615). Estes vectores são vulgarmente utilizados pelos investigadores académicos ou estão disponíveis vectores semelhantes a partir de vários diferentes vendedores, tal como Invitrogen (Carlsbad, CA), Pharmacia (Piscataway, NJ), New England Biolabs (Beverly, MA). Constituem exemplos pYES&GS, 2<sub>μ</sub> origem do plasmídeo de expressão de levedura baseada na replicação da Invitrogen ou veículo de clonagem Yep24 do New England Biolabs. Após ligação do ADN cromossómico e do vector, é possível transformar a biblioteca de ADN em estirpe de *S. cerevisiae* com uma mutação específica e seleccionar a correcção do fenotipo correspondente. Após subclonagem e sequenciação do fragmento de ADN capaz de restaurar o fenotipo de tipo selvagem, é possível utilizar este fragmento para eliminar a actividade do produto genético codificado por OCH1 em *P.pastoris*.

Em alternativa, se a totalidade da sequência genómica de um fungo específico de interesse é conhecida, é possível identificar estes genes apenas por meio de pesquisa das bases de dados de ADN disponíveis ao público, as quais são disponibilizadas por várias fontes, tal como NCBI, Swissprot, etc. Por exemplo, ao pesquisar uma dada sequência genómica ou base de dados com um gene de 1,6



manosiltransferase conhecido (OCH1) de *S. cerevisiae* é possível identificar genes com grande homologia num genoma em que um elevado grau de certeza codifica um gene com actividade 1,6 manosiltransferase. Homólogos de várias manosiltransferases conhecidas de *S. cerevisiae* em *P.pastoris* têm sido identificados com qualquer uma destas abordagens. Estes genes têm funções semelhantes aos genes envolvidos na manosilação de proteínas em *S. cerevisiae* e pode-se utilizar deste modo a sua eliminação para manipular o padrão de glicosilação em *P.pastoris* ou qualquer outro fungo com vias de glicosilação semelhantes.

A criação de knock-outs de genes assim que é determinada uma dada sequência genética, é uma técnica bem estabelecida na comunidade da biologia molecular das leveduras e fungos e pode ser dominada por quem possuir uma formação ordinária na técnica (R-Rothsteins, (1991) *Methods in Enzymology*, vol 194, p. 281). De facto, a escolha de um organismo hospedeiro pode ser influenciada pela disponibilidade de boas técnicas de transformação e interrupção de genes para esse hospedeiro. Se várias manosiltransferases têm de ser sujeitas a *knock out*, o método desenvolvido por Alani e Kleckner permite a utilização repetida dos marcadores URA3 para eliminar sequencialmente toda a actividade manosiltransferase endógena indesejada. Esta técnica tem sido aperfeiçoada por outros, mas basicamente envolve a utilização de duas sequências de ADN repetidas, a flanquear um marcador contrasseleccionável. Por exemplo: URA3 pode ser utilizado como marcador para garantir a selecção de transformantes com uma construção genética integrada. Ao flanquear o marcador URA3 com repetições directas é possível seleccionar primeiro os transformantes com a

construção integrada e, portanto, com o gene alvo interrompido. Após o isolamento dos transformantes e respectiva caracterização, é possível contrasseleccionar uma segunda volta para aqueles que são resistentes a 5'FOA. As colónias que são capazes de sobreviver em placas contendo 5'FOA perderam novamente o marcador URA3 através de um evento *cross-over*, envolvendo as repetições mencionadas anteriormente. Esta abordagem permite assim a repetida utilização do mesmo marcador e facilita a interrupção de múltiplos genes sem necessitar de marcadores adicionais.

A eliminação de manosiltransferases específicas, tal como 1,6 manosiltransferase (OCH1), manosilfosfato transferases (MNN4, MNN6 ou genes complementares de *lbd* mutante) em *P.pastoris* permite a criação de estirpes manipuladas deste organismo, as quais sintetizam em primeiro lugar Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> e podem assim ser utilizadas para modificar ainda mais o padrão de glicosilação para se assemelhar mais às estruturas glicoforma humanas mais complexas. Uma forma de realização preferida deste método utiliza sequências de ADN conhecidas, codificadoras de actividades de glicosilação bioquímicas conhecidas para eliminar funções bioquímicas semelhantes ou idênticas em *P.pastoris*, de modo que a estrutura de glicosilação da estirpe *P.pastoris* geneticamente alterada resultante fica modificada.

Quadro 2

Iniciador PCR A	Iniciador PCR B	Gene(s) alvo em <i>P.pastoris</i>	Homólogos
ATGGCGAAGGCAGATGG CAGT	TTAGTCCTTCCAAC TTCCTTC	1,6- manosiltransf erase	OCH1 <i>S.cerevisiae</i> , <i>Pichia</i>

			<i>albicans</i>
TAYTGGMGNGTNGARCY NGAYATHAA	GCRTCNCCCCANCK YTCRTA	1,2 manosiltransf erases	Família KTR/KRE , <i>S.cerevi siae</i>
Legenda: M=A ou C, R=A ou G, W = A ou T, S = C ou G, Y = C ou T, K=G ou T, V=A ou C ou G, H=A ou C ou T, D= A ou G ou T, B = C ou G ou T, N = G ou A ou T ou C.			

### Incorporação De Uma Manosidase No Hospedeiro Geneticamente Manipulado

O processo presentemente descrito permite obter uma estrutura com elevado rendimento com intenção de a modificar para se obter N-glicanos complexos. Um esquema com êxito para obter estruturas  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  adequadas tem de envolver duas abordagens paralelas: (1) redução da actividade de manosiltransferase endógena e (2) remoção de 1,2- $\alpha$ -manose por manosidasas para se obter elevados níveis de estruturas  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  adequadas. Este método distingue-se da técnica anterior na medida em que lida directamente com estas duas abordagens. Tal como ficou demonstrado pelo trabalho de Chiba e colegas, é possível reduzir estruturas  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  para um isómero  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  em *S. cerevisiae* por meio da alteração na presença de uma manosidase fúngica de *A.saitoi* no RE. As deficiências desta abordagem são duas: (1) quantidades insuficientes de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  são formadas na fracção de glicoproteína extra-celular (10 %) e (2) não é óbvio que a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  formada *in vivo* seja, de facto, capaz de aceitar GlcNAc por meio da acção de transferase I GlcNAc. Se estiverem presentes vários locais de glicosilação numa proteína desejada, a probabilidade (P)

de obtenção desta proteína de uma forma correcta obedece à relação  $P=(F)^n$ , sendo  $n$  igual ao número de locais de glicosilação e  $F$  igual à fracção de glicoformas desejadas. Uma glicoproteína com três locais de glicosilação teria 0,1 % de probabilidade de fornecer os precursores apropriados para o processamento de N-glicano complexo e híbrido em todos os seus locais de glicosilação, o que limita o valor comercial desta abordagem.

A maioria das enzimas que estão activas no RE e aparelho de Golgi de *S. cerevisiae* têm pH óptimos, situados entre 6,5 e 7,5 (consultar quadro 3). Todas as abordagens anteriores para reduzir a manosição por meio da acção de manosidases recombinantes concentraram-se nas enzimas com um pH óptimo, de cerca de 5,0 (Martinet et al., 1998 e Chiba et al., 1998), apesar da actividade destas enzimas estar reduzida a menos de 10 % a pH 7,0 e muito provavelmente proporcionar uma actividade insuficiente no ponto de utilização, o RE e Golgi primordial de *P.pastoris* e *S. cerevisiae*. Um processo preferido utiliza uma  $\alpha$ -manosidase *in vivo*, em que o pH óptimo da manosição está situado entre as unidades de pH 1,4 do pH óptimo médio de outras enzimas marcadoras representativas, localizadas no(s) mesmo(s) organelo(s). O pH óptimo da enzima a ser endereçada para um organelo específico deve ser equivalente ao pH óptimo de outras enzimas encontradas no mesmo organelo, de forma a obter-se a actividade máxima por enzima unitária. O quadro 3 resume a actividade das manosidases de várias fontes e respectivos pH óptimos. O quadro 4 resume a respectiva localização.

Quadro 3 Manosidases e respectivo pH óptimo.

Fonte	Enzima	pH óptimo	Referência
<i>Aspergillus saitoi</i>	1,2- $\alpha$ - manosidase	5,0	Ichishima et al., 1999 Biochem. J. 339(Pt 3):589-597
<i>Trichoderma reesei</i>	1,2- $\alpha$ - manosidase	5,0	Maras et al., 2000 J. Biotechnol. 77 (2-3):255-263
<i>Penicillium citrinum</i>	1,2- $\alpha$ -D- manosidase	5,0	Yoshida et al., 1993 Biochem. J. 290(Pt 2):349-354
<i>Aspergillus nidulans</i>	1,2- $\alpha$ - manosidase	6,0	Eades and Hintz, 2000
<i>Homo sapiens</i> IA(Golgi)	1,2- $\alpha$ - manosidase	6,0	
<i>Homo sapiens</i> IB (Golgi)	1,2- $\alpha$ - manosidase	6,0	
Células de insecto lepidóptero	1,2- $\alpha$ -Man <sub>6</sub> - manosidase tipo I	6,0	Ren et al.,1995 Biochem. 34(8): 2489-2495
<i>Homo sapiens</i>	$\alpha$ - D- manosidase	6,0	Chandrasekaran et al., 1984 Cancer Res. 44(9):4059-68
<i>Xanthomonas manihotis</i>	1,2,3- $\alpha$ - manosidase	6,0	
IB de ratinho (Golgi)	1,2- $\alpha$ - manosidase	6,5	Schneikert e Herscovics, 1994 Glycobiology. 4(4):445- 50
<i>Bacillus</i> sp.	1,2- $\alpha$ -D-	7,0	Maruyama et

(segregado)	manosidase		al., 1994 Carbohydrate Res. 251:89- 98
-------------	------------	--	---

Ao tentar encurtar estruturas de elevado teor de manose para se obter  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  no RE ou no aparelho de Golgi de *S. cerevisiae*, é possível escolher qualquer enzima ou combinação de enzimas que (1) possua(m) um pH óptimo suficientemente próximo (isto é entre pH 5,2 e pH 7,8) e (2) é/são conhecidas por gerar, isoladamente ou conjuntamente, a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  isomérica específica necessária para aceitar a subsequente adição de GlcNAc por GnT I. Qualquer enzima ou combinação de enzimas que tenha(m) revelado gerar uma estrutura que possa ser convertida em  $\text{GlcNAc Man}_5\text{GlcNAc}_2$  por GnT I *in vitro* constituiria uma opção adequada. Esta noção pode ser obtida a partir da literatura científica ou experimentalmente, por meio da determinação de que uma manosidase potencial pode converter  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  em  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  e testes subsequentes da possibilidade de a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  servir como substrato para GnT I e UDP-GlcNAc produzir  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  *in vitro*. Por exemplo, manosidase IA de origem humana ou de murino seria uma opção adequada.

#### Actividade A-1,2-Manosidase No RE E Golgi

Abordagens anteriores para reduzir a manosição pela acção de manosidasas exógenas clonadas não conseguiram produzir glicoproteínas com uma fracção suficiente (por exemplo > 27 % em mole) de N-glicanos com a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (Martinet et al., 1998, and Chiba et al., 1998). Estas enzimas devem funcionar eficientemente no RE ou aparelho de

Golgi para serem eficazes na conversão de glicoproteínas nascentes. Enquanto as duas manosidases utilizadas na técnica anterior (de *A.saitoi* e *T.reesei*) têm pH óptimos de 5,0, a maioria das enzimas que são activas no RE e aparelho de Golgi da levedura (por exemplo *S. cerevisiae*) têm pH óptimos que se situam entre 6,5 e 7,5 (ver quadro 3). Uma vez que a glicosilação de proteínas é um processo muito desenvolvido e eficiente, pode-se concluir que o pH interno do RE e do aparelho de Golgi se situa também entre cerca de 6 e 8. A pH 7,0, a actividade da manosidase utilizada na técnica anterior fica reduzida para menos de 10 %, o que é insuficiente para a produção eficiente de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  *in vivo*. O trabalho de Chiba foi também descrito na EP-A1 1.211.310. São apresentados comentários adicionais na anterior.

Quadro 4 Localização celular e pH óptimos de várias enzimas de *S. cerevisiae* relacionadas com glicosilação.

Gene	Actividade	Localização	pH óptimo	Autor(es)
<i>Ktr1</i>	$\alpha$ -1,2 manosiltransferase	Golgi	7,0	Romero et al., 1997 Biochem. J. 321 (Pt 2):289- 295
<i>Mns1</i>	$\alpha$ -1,2- manosidase	RE	6,5	
<i>CWH41</i>	glucosidase I	RE	6,8	
-	manosiltransferase	Golgi	7-8	Lehele and Tanner, 1974

				Biochim. Biophys. Acta 350(1): 225-235
<i>Kre2</i>	$\alpha$ -1,2 manosiltransferase	Golgi	6,5-9,0	Romero et al., 1997

A enzima  $\alpha$ -1,2-manosidase deve ter uma actividade óptima a um pH entre 5,1 e 8,0. Numa forma de realização preferida, a enzima tem uma actividade óptima a um pH entre 5,9 e 7,5. O nível óptimo de pH pode ser determinado sob condições de análise *in vitro*. As manosidases preferidas incluem as que se encontram listadas no quadro 3 com pH óptimos apropriados, por exemplo *Aspergillus nidulans*, *Homo sapiens* IA (Golgi), *Homo sapiens* IB (Golgi), célula de insecto lepidóptero (IPLB-SF21AE), *Homo sapiens*, IB de rato (Golgi) e *Xanthomonas manihotis*. Numa forma de realização preferida é expresse um único gene de manosidase clonado no organismo hospedeiro. No entanto, nalguns casos poderá ser desejável expressar vários genes de manosidase diferentes ou várias cópias de um gene em particular a fim de atingir uma produção adequada de Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Nos casos em que são utilizados múltiplos genes, as manosidases codificadas devem todas ter pH óptimos, dentro dos limites preferidos de 5,1 a 8,0 ou especialmente entre 5,9 e 7,5. Numa forma de realização especialmente preferida, a actividade manosidase é endereçada para o RE ou Golgi cis, onde ocorrem as primeiras reacções de glicosilação.

#### Formação De N-Glicanos Complexos



Uma segunda etapa do processo envolve a adição sequencial de açúcares à estrutura de hidrato de carbono nascente por meio de manipulação da expressão de glucosiltransferases no aparelho de Golgi. Este processo exige, em primeiro lugar, a expressão funcional de GnT I no aparelho de Golgi cis ou mediano, bem como garantir o fornecimento suficiente de UDP-GlcNAc.

#### Locais De Integração

Uma vez que o objectivo último deste esforço de engenharia genética é uma estirpe robusta produtora de proteína, capaz de ter um bom desempenho num processo de fermentação industrial, a integração de múltiplos genes no cromossoma fúngico envolve planeamento cuidadoso. A estirpe manipulada terá, muito provavelmente, de ser transformada com uma gama de genes diferentes e estes genes terão de ser transformados de um modo estável para garantir que a actividade desejada é mantida ao longo do processo de fermentação. Uma combinação das actividades enzimáticas seguintes terá de ser manipulada no hospedeiro de expressão da proteína fúngica sialiltransferases, manosidases, fucosiltransferases, galactosiltransferases, glucosiltransferases, GlcNActransferases, transportadores específicos do RE e Golgi (por exemplo transportadores simporta e antiporta para USP-galactose e outros precursores) outras enzimas envolvidas no processamento de oligossacarídeos e enzimas envolvidas na síntese de precursores oligossacarídeos activados, tal como UDP-galactose, ácido CMP-N-acetilneuramínico. Ao mesmo tempo terão de ser eliminados vários genes que codificam enzimas

conhecidas como sendo características de reacções de glicosilação não-humanas.

#### Endereçamento De Glicosiltransferases Para Organelos Específicos:

As glicosiltransferases e manosidases revestem a superfície interna (luminal) do RE e aparelho de Golgi e proporcionam, assim, uma superfície "catalítica", que permite o processamento sequencial de glicoproteínas, à medida que progridem através do RE e rede Golgi. De facto, as múltiplas cisternas do Golgi cis, mediano e trans e a rede trans-Golgi (trans-Golgi Network - TGN) proporcionam as diferentes localidades onde pode ter lugar a sequência ordenada das reacções de glicosilação. À medida que a glicoproteína progride desde a síntese no RE até à maturação plena no Golgi trans ou TGN, é exposta sequencialmente a diferentes glicosidases, manosidases e glicosiltransferases, de modo que pode ser sintetizada uma estrutura de hidrato de carbono específica. Tem sido dedicado muito trabalho à revelação do mecanismo exacto de retenção e ancoragem destas enzimas no seu organelo respectivo. A figura evolutiva é complexa, mas as provas sugerem que a região tronco, região transmembrana e cauda citoplasmática dirigem, individualmente ou em conjunto, as enzimas para a membrana de organelos individuais e localizam assim o domínio catalítico associado para esse *locus*.

As sequências de endereçamento são bem conhecidas e descritas na literatura científica e bases de dados públicas, tal como discutido mais detalhadamente em

seguida, no que respeita a bibliotecas para a selecção de sequências de endereçamento e enzimas endereçadas.

#### Método Para A Produção De Uma Biblioteca Para Produzir Vias De Glicosilação Modificadas

Uma biblioteca que inclui pelo menos dois genes codificadores das enzimas de glicosilação exógenas é transformada no organismo hospedeiro, produzindo uma população geneticamente mista. Os transformantes com os fenótipos de glicosilação desejados são depois seleccionados a partir da população mista. Numa forma de realização preferida, o organismo hospedeiro é uma levedura, em especial *P.pastoris*, e a via de glicosilação hospedeira é modificada pela expressão operativa de uma ou mais enzimas de glicosilação humanas ou animais, rendendo N-glicanos proteicos semelhantes ou idênticos às glicoformas humanas. Numa forma de realização especialmente preferida, a biblioteca de ADN inclui construções genéticas codificadoras de fusões de enzimas de glicosilação com sequências de endereçamento para vários *loci* celulares, envolvidos na glicosilação, em especial o RE, Golgi cis, Golgi mediano ou Golgi trans.

Constituem exemplos de modificações da glicosilação que podem ser efectuadas utilizando este método: (1) manipulação de um microrganismo eucariota para encurtar resíduos de manose de  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , para se obter  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  como um N-glicano proteico; (2) manipulação de um microrganismo eucariota para adicionar um resíduo N-acetilglucosamina (GlcNAc) a  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  por meio da acção de transferase I GlcNAc; (3) manipulação de um

microrganismo eucariota para expressar de forma funcional uma enzima, tal como uma N-acetilglucosamina transferase (GnT I, GnT II, GnT III, GnT IV, GnT V, GnT VI), manosidase II, fucosiltransferase, galactosil tranferase (GaIT) ou sialiltransferases (ST).

Por meio da repetição do método, podem ser manipuladas vias de glicosilação cada vez mais complexas no microrganismo alvo. Numa forma de realização preferida, o organismo hospedeiro é transformado duas ou mais vezes com bibliotecas de ADN, incluindo sequências codificadoras das actividades de glicosilação. A selecção dos fenótipos desejados pode ser executada após cada ronda de transformação ou, em alternativa, após terem ocorrido várias transformações. As vias de glicosilação complexas podem ser rapidamente manipuladas deste modo.

#### Bibliotecas De ADN

É necessário montar uma biblioteca de ADN, incluindo pelo menos dois genes exógenos, codificadores de enzimas de glicosilação. Para além de sequências de grelha de leitura aberta, é geralmente preferível proporcionar cada construção de biblioteca com os promotores, de transcrição, intensificadores, locais de ligação de ribossomas e outras sequências funcionais que possam ser necessários para garantir a efectiva transcrição e tradução dos genes após transformação no organismo hospedeiro. Quando o hospedeiro é *Pichia pastoris*, os promotores adequados incluem, por exemplo, os promotores AOX1, AOX2, DAS e P40. É também preferível proporcionar cada construção com pelo menos um marcador de selecção, tal como um gene de resistência a

medicamentos ou que complemente uma lesão metabólica do hospedeiro. A presença do marcador é útil na selecção subsequente de transformantes, por exemplo, em leveduras podem ser utilizados os genes URA3, H154, SUC2, G418, BLA ou SH BLE. Nalguns casos, a biblioteca pode ser elaborada directamente a partir de genes de tipo selvagem existentes. Numa forma de realização preferida, contudo, a biblioteca de ADN é elaborada a partir da fusão de duas ou mais bibliotecas. Por meio da ligação "in-frame" das subbibliotecas é possível criar um grande número de novas construções genéticas codificadoras de actividades de glicosilação endereçadas úteis. Por exemplo, uma subbiblioteca útil inclui sequências de ADN, codificadoras de qualquer combinação de enzimas, tal como sialiltransferases, manosidases, fucosiltransferases, galactosiltransferases, glucosiltransferases e GZcNAc transferases. De preferência, as enzimas são de origem humana, muito embora as enzimas de mamífero, animais ou fúngicas sejam também úteis. Numa forma de realização preferida, os genes são truncados para se obter fragmentos codificadores dos domínios catalíticos das enzimas. Por meio da remoção de sequências endereçadas endógenas, as enzimas podem ser então reorientadas e expressas noutros *loci* celulares. A escolha destes domínios catalíticos pode ser guiada pelo conhecimento do ambiente específico em que o domínio catalítico deverá depois estar activo. Por exemplo, se uma enzima de glicosilação específica deve estar activa no Golgi trans e todas as enzimas conhecidas do organismo hospedeiro no Golgi trans têm um certo pH óptimo, então é escolhido um domínio catalítico que exhibe actividade adequada a esse pH.

Outra sub-biblioteca útil inclui sequências de ADN codificadoras de peptídeos de sinal, que têm como resultado a localização de uma proteína para uma localização específica no RE, Golgi ou rede Golgi trans. Estas sequências de sinal podem ser seleccionadas de um organismo hospedeiro, bem como de outros organismos relacionados ou não relacionados. As proteínas do RE ou Golgi ligadas à membrana podem incluir tipicamente, por exemplo, sequências N-terminal codificadoras de uma cauda citosólica (cytosolic tail - ct), um domínio transmembrana (transmembrane domain - tmd) e uma região tronco (stem region - sr). As sequências ct, tmd e sr são suficientes individualmente ou em combinação com proteínas âncora para a membrana interna (lumenal) do organelo. Assim, uma forma de realização preferida da sub-biblioteca da sequência de sinal inclui sequências ct, tmd e/ou sr destas proteínas. Nalguns casos será desejável proporcionar a sub-biblioteca com comprimentos variados da sequência sr. Este aspecto poderá ser realizado por meio de PCR, utilizando iniciadores que ligam ao terminal 5' do ADN codificador da região citosólica e empregando uma série de iniciadores opostos, que ligam a diversas partes da região tronco. Ainda outras fontes úteis de sequências de sinal incluem peptídeos de sinal de recuperação, por exemplo o tetrapeptídeo HDEL ou KDEL, que se encontram tipicamente no terminal C das proteínas que são transportadas retrogradamente para o RE ou Golgi. Ainda outras fontes de sequências de sinal incluem (a) proteínas de membrana tipo II, (b) as enzimas listadas no quadro 3, (c) transportadores de açúcar nucleotídeo transmembrana, que estão localizados no Golgi e (d) as sequências indicadas no quadro 5.

Quadro 5 Fontes de sequências úteis de endereçamento compartimental

Gene ou sequência	Organismo	Função	Localização do produto genético
Mns1	<i>S. cerevisiae</i>	$\alpha$ -1,2-manosidase	RE
OCH1	<i>S. cerevisiae</i>	1,6-manosiltransferase	Golgi (cis)
MNN2	<i>S. cerevisiae</i>	1,2-manosiltransferase Golgi (mediano)	
MNN1	<i>S. cerevisiae</i>	1,3-manosiltransferase	Golgi (trans)
OCH1	<i>P. pastoris</i>	1,6-manosiltransferase	Golgi (cis)
2,6 ST	<i>H. sapiens</i>	2,6-sialiltransferase	Rede trans Golgi
UDP-Gal T	<i>S. pombe</i>	Transportador UDP-Gal	Golgi
Mnt1	<i>S. cerevisiae</i>	1,2-manosiltransferase	Golgi (cis)
HDEL no terminal C <i>S. cerevisiae</i>	Sinal de recuperação	RE	

Em qualquer caso, a preferência vai toda para a selecção das sequências de sinal que sejam apropriadas para a actividade enzimática ou actividades destinadas a serem manipuladas no hospedeiro. Por exemplo, no desenvolvimento de um microrganismo modificado, capaz de sialilação terminal de N-glicanos nascentes, um processo que ocorre no Golgi trans em seres humanos, é desejável utilizar uma sub-biblioteca de sequências de sinal derivada das proteínas de Golgi trans. De modo semelhante, o encurtamento de

Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> por uma  $\alpha$ -1,2-manosidase, para se obter Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> é uma etapa inicial na formação de N-glicano complexo em seres humanos. Por conseguinte é desejável que esta reacção ocorra no RE ou Golgi cis de um microrganismo hospedeiro manipulado. É utilizada uma sub-biblioteca codificadora do RE e sinais de retenção de Golgi cis.

Numa forma de realização preferida, uma biblioteca de ADN é então construída pela ligação *in-frame* de uma sub-biblioteca incluindo sequências de sinal codificadoras do ADN com uma sub-biblioteca incluindo enzimas de glicosilação codificadoras do ADN ou respectivos fragmentos com actividade catalítica. A biblioteca resultante inclui genes sintéticos codificadoras de proteínas de fusão. Nalguns casos será desejável proporcionar uma sequência de sinal no terminal N de uma proteína de fusão ou, noutros casos, no terminal C. Nalguns casos as sequências de sinal podem ser inseridos na estrutura de leitura aberta de uma enzima, desde que a estrutura proteica dos domínios entrelaçados individualmente não seja interrompida.

O método é mais eficaz quando uma biblioteca de ADN, transformada no hospedeiro, contém uma grande diversidade de sequências, aumentando assim a probabilidade de pelo menos um transformante venha a exibir o fenotipo desejado. Assim, antes da transformação, uma biblioteca de ADN ou uma sub-biblioteca constituinte podem ser sujeitas a uma ou várias rondas de transposição genética, *error prone PCR* ou mutagénese *in vitro*.

Transformação



A biblioteca de ADN é depois transformada no organismo hospedeiro. Na levedura pode ser empregue qualquer método conveniente de transferência de ADN, tal como electroporação, o método do cloreto de lítio ou o método dos esferoplastos. Para produzir uma estirpe estável, adequada para fermentação de elevada densidade, será desejável integrar as construções da biblioteca de ADN no cromossoma hospedeiro. Numa forma de realização preferida, a integração ocorre pela recombinação homóloga, utilizando técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, os elementos da biblioteca de ADN são fornecidos com sequências de flanqueamento homólogas das sequências do organismo hospedeiro. Deste modo, ocorre a integração num local definido no genoma hospedeiro, sem interrupção de genes desejáveis ou essenciais. Numa forma de realização especialmente preferida, o ADN da biblioteca é integrado no local de um gene indesejado, num cromossoma hospedeiro, efectuando a interrupção ou eliminação do gene. Por exemplo, a integração nos locais dos genes OCH1, MNN1 ou MNN4 permite a expressão do ADN da biblioteca desejado enquanto impede a expressão de enzimas envolvidas na hipermanosilação de levedura de glicoproteínas. Noutras formas de realização, o ADN da biblioteca pode ser introduzido no hospedeiro por meio de um cromossoma, plasmídeo, vector retrovítico ou integração aleatória no genoma hospedeiro. Em qualquer caso, em geral é desejável incluir com cada construção de ADN de biblioteca pelo menos um gene marcador seleccionável, para permitir uma pronta selecção de organismos hospedeiros que tenham sido transformados com estabilidade. Os genes marcadores

recicláveis, tal como *ura3*, que podem ser seleccionados para ou contra, são especialmente adequados.

#### Processo de selecção

Após a transformação da estirpe hospedeira com a biblioteca de ADN, são seleccionados os transformantes com o fenotipo de glicosilação desejado. A selecção pode ser executada numa etapa única ou por meio de uma série de enriquecimentos fenotípicos e/ou etapas de depleção, utilizando qualquer um de uma variedade de análises ou métodos de detecção. A caracterização fenotípica pode ser efectuada manualmente ou utilizando um equipamento de rastreio de elevado débito automático. Vulgarmente, um microrganismo hospedeiro apresenta N-glicanos proteicos à superfície da célula, onde estão localizadas várias glicoproteínas. Em conformidade, podem ser rastreadas células inteiras para detectar um fenotipo de glicosilação desejado, expondo as células a uma lectina ou anticorpo que liga especificamente ao N-glicano desejado. Uma ampla variedade de lectinas específicas de oligossacarídeos está disponível no comércio (EY Laboratories, San Mateo, CA). Em alternativa, anticorpos de N-glicanos humanos ou animais específicos estão disponíveis no comércio ou podem ser produzidos por meio de técnicas padrão. Uma lectina ou anticorpo apropriado pode ser conjugado numa molécula relatora, tal como um cromóforo, fluoróforo, radioisótopo ou uma enzima com substrato cromogénico (Guillen et al., 1998. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 95(14): 7888-7892). O rastreio pode então ser executado, utilizando métodos analíticos, tal como espectrofotometria, fluorimetria,

selecção celular activada por fluorescência ou contagem da cintilação. Noutros casos, poderá ser necessário analisar glicoproteínas ou N-glicanos isolados a partir de células transformadas. O isolamento de proteínas pode ser efectuado por meio de técnicas conhecidas na técnica. Em casos em que é necessário um N-glicano isolado, pode ser utilizada uma enzima tal como endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidase (Genzyme Co., Boston, MA) para clivar os N-glicanos das glicoproteínas. As proteínas isoladas ou os N-glicanos podem então ser analisados por meio de cromatografia líquida (por exemplo HPLC), espectroscopia de massa ou outros meios adequados. A patente norte-americana n° 5,595,900 explica vários métodos, por meio dos quais podem ser identificadas estruturas hidrato de carbono extracelulares desejadas. Antes da selecção de um transformante desejado, poderá ser desejável eliminar da população transformada as células com fenótipos indesejados. Por exemplo, quando o método é utilizado para manipular uma actividade de manosidase funcional em células, os transformantes desejados terão níveis inferiores de manose na glicoproteína celular. A exposição da população transformada a um radioisótopo letal de manose no meio elimina a população de transformantes com fenótipos indesejados, isto é níveis elevados de manose incorporada. Em alternativa, pode ser utilizada uma lectina citotóxica ou anticorpo, orientados para um N-glicano indesejado, para eliminar uma população transformada de fenótipos indesejados.

Método Para Fornecimento De Precursores De Nucleotídeos de Açúcar Ao Aparelho De Golgi

Para que uma glicosiltransferase funcione satisfatoriamente no Golgi, é necessário que a enzima esteja preparada com uma concentração suficiente de um açúcar nucleotídeo adequado, que é o dador de elevada energia da fracção açúcar adicionada a uma glicoproteína nascente. Estes açúcares nucleotídeo para o compartimento adequado são fornecidos pela expressão de um gene exógeno, codificador de um transportador de um nucleotídeo açúcar no microrganismo hospedeiro. A escolha da enzima transportadora é influenciada pela natureza da glicosiltransferase exógena utilizada. Por exemplo, uma transferase GlcNAc pode exigir um transportador UDP-GlcNAc, uma fucosiltransferase pode exigir um transportador GDP-fucose, uma galactosiltransferase pode exigir um transportador UDP-galactose ou uma sialiltransferase pode exigir um transportador ácido siálico CMP. A proteína transportadora adicionada faz passar um açúcar nucleotídeo do citosol para o aparelho de Golgi, onde o açúcar nucleotídeo pode ser feito reagir pela glicosiltransferase, por exemplo para alongar um N-glicano. A reacção libera um nucleosídeo-difosfato ou monofosfato, por exemplo UDP, GDP ou CMP. Como a acumulação de um nucleosídeo-difosfato inibe mais actividade de uma glicosiltransferase, é frequentemente desejável também proporcionar uma cópia expressa de um gene codificador de um nucleotídeo difosfatase. A difosfatase (específica para UDP ou GDP conforme apropriado) hidrolisa o difosfonucleosídeo para se obter nucleosídeo-monofosfato e fosfato inorgânico. O nucleosídeo-monofosfato não inibe a glicotransferase e, em qualquer dos casos, é exportado do Golgi por um sistema celular endógeno. Em seguida são descritas enzimas

transportadoras adequadas, que são tipicamente de origem mamífera.

### Exemplos

A utilização do método geral anteriormente descrito pode ser entendida através da consulta dos seguintes exemplos não limitadores. Os exemplos das formas de realização preferidas são resumidos no quadro 6.

Exemplo 1: Manipulação de *P.pastoris* com  $\alpha$ -1,2-manosidase para produzir interferão

Uma  $\alpha$ -1,2-manosidase é necessária para o encurtamento de  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , para se obter  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , um intermediário essencial para a formação de N-glicanos complexos. Um OCH1 mutante de *P.pastoris* é manipulado para exprimir interferão- $\beta$  humano segregado, sob o controlo de um promotor aox. A biblioteca de ADN é construída pela ligação *in-frame* do domínio catalítico de manosidase humana IB (uma  $\alpha$ -1,2-manosidase) com uma sub-biblioteca incluindo sequências codificadoras de peptídeos de localização Golgi trans. A biblioteca de ADN é depois transformada no organismo hospedeiro, resultando numa população geneticamente misturada, em que transformantes individuais exprimem cada um interferão- $\beta$ , bem como um gene de manosidase sintético da biblioteca. As colónias de transformante individuais são cultivadas e a produção do interferão é induzida por meio da adição de metanol. Nestas condições, mais de 90 % da proteína segregada inclui interferão- $\beta$ . Os sobrenadantes são purificados para remover

sais e contaminantes de baixo peso molecular por meio de cromatografia de fase inversa sílica C18. Os transformantes desejados que exprimem  $\alpha$ -1,2-manosidase activa, adequadamente endereçada, produzem interferção- $\beta$ , incluindo N-glicanos com a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , a qual possui uma massa molecular reduzida em comparação com o interferão da estirpe progenitora. Os sobrenadantes purificados, incluindo o interferão- $\beta$ , são analisados por espectroscopia de massa MALDI-TOF e as colónias que expressam a forma desejada de interferão- $\beta$  são identificadas.

#### Exemplo 2: Manipulação da estirpe para exprimir GlcNAc Transferase I

A actividade GlcNAc transferase I é necessária para a maturação de N-glicanos complexos.  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  só pode ser encurtado por manosidase II, uma etapa necessária na formação de glicofomas humanas, após a adição de GlcNAc ao resíduo  $\alpha$ -1,3-manose terminal por GlcNAc transferase I (Schachter, 1991 Glycobiology 1(5):453-461). Em conformidade, é preparada uma biblioteca, incluindo fragmentos de ADN codificador de genes de GlcNAc transferase I adequadamente endereçados. O organismo hospedeiro é uma estirpe, por exemplo uma levedura, que é deficiente em hipermanosilação (por exemplo, um mutante OCH1), proporciona o substrato UDP-GlcNAc no Golgi e/ou RE e proporciona N-glicanos com a estrutura  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  no Golgi e/ou RE. Após transformação do hospedeiro com a biblioteca de ADN, os transformantes são rastreados para detectar os que possuem a maior concentração de GlcNAc terminal na superfície da célula ou, alternativamente,

segregam a proteína com o maior teor de GlcNAc terminal. Um rastreio assim é executado com um método visual (por exemplo com um procedimento de coloração), um anticorpo de ligação GlcNAc terminal específico ou uma lectina. Em alternativa, os transformantes desejados exibem uma ligação reduzida de certas lectinas específicas de resíduos de manose terminal.

### Exemplo 3: Manipulação de estirpes com uma manosidase II

Noutro exemplo, a fim de gerar uma glicoforma humana num microrganismo, será desejável remover as duas manoses terminais restantes da estrutura  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  por meio da acção de uma manosidase II. Uma biblioteca de ADN, incluindo sequências codificadoras dos sinais de localização Golgi cis e mediano, é fundida *in-frame* a uma biblioteca codificadora dos domínios catalíticos manosidase II. O organismo hospedeiro é uma estirpe, por exemplo uma levedura, que é deficiente em hipermanosilação (por exemplo, um mutante OCH1) e proporciona N-glicanos com a estrutura  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  no Golgi e/ou RE. Após transformação, são seleccionados os organismos com o fenotipo de glicosilação desejado. Uma análise *in vitro* é utilizada num método. A estrutura desejada  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  (mas não a  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  indesejada) é um substrato para a enzima GlcNAc transferase II. Nesta conformidade, podem ser analisadas colónias individuais, utilizando esta enzima *in vitro* na presença do substrato, UDP-GlcNAc. A libertação de UDP é determinada seja por HPLC ou uma análise enzimática para UDP. Em alternativa é utilizado UDP-GlcNAc rotulado radioactivamente.

As análises *in vitro* anteriores são adequadamente executadas em colónias individuais, utilizando equipamento de rastreio de elevado débito. Em alternativa, é utilizada uma análise de ligação de lectina. Neste caso, a reduzida ligação das lectinas específica das manoses terminais permite a selecção de transformantes com o fenotipo desejado. Por exemplo, lectina de *Galantus nivalis* liga especificamente a  $\alpha$ -1,3-manose terminal, cuja concentração é reduzida na presença da actividade de manosidase II expressa operativamente. Num método adequado, lectina de *G.nivalis* ligada a um suporte de agarose sólido (disponível junto da Sigma Chemical, St Louis, MO) é utilizado para eliminar a população transformada de células com elevados níveis de  $\alpha$ -1,3-manose terminal.

#### Exemplo 4: Manipulação de organismos para exprimir sialiltransferase

As enzimas  $\alpha$ -2,3-sialiltransferase e  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase acrescentam ácido siálico terminal aos resíduos de galactose em N-glicanos humanos nascentes, conduzindo a glicoproteínas maduras. No ser humano as reacções ocorrem no Golgi trans ou TNG. Nesta conformidade, uma biblioteca de ADN é construída pela fusão *in-frame* de sequências codificadoras de domínios catalíticos de sialiltransferase, com sequências codificadoras de sinais de localização Golgi trans ou TNG. O organismo hospedeiro é uma estirpe, por exemplo uma levedura, que é deficiente em hipermanosilação (por exemplo, um mutante OCH1), que proporciona N-glicanos com resíduos galactose terminais no Golgi trans ou TNG e proporciona uma concentração



suficiente de ácido siálico CMP no Golgi trans ou TGN. A seguir à transformação, os transformantes com o fenotipo desejado são seleccionados com um anticorpo fluorescente específico para N-glicanos com um ácido siálico terminal.

#### Exemplo 5: Método de manipulação de estirpes para exprimir transportador UDP-GlcNAc

O cADN de transportador UDP-GlcNAc Golgi humano foi clonado por Ishida e colaboradores. (Ishida, N., et al. 1999 J. Biochem.126(1): 68-77). Guillen e colaboradores clonaram o transportador UDP-GlcNAc de Golgi de rim canino por meio de correcção de um *Kluyveromyces lactis* mutante, deficiente em transporte Golgi UDP-GlcNAc. (Guillen. E., et al. 1998). Assim, um gene transportador UDP-GlcNAc de Golgi de mamífero possui toda a informação necessária para que a proteína seja expressa e endereçada de modo funcional para o aparelho de Golgi da levedura.

#### Exemplos 6: Método de manipulação de estirpes para exprimir transportador GDP-fucose

O transportador de GDP-fucose membrana de Golgi de fígado de rato foi identificado e purificado por Puglielli, L. e C. B. Hirschberg 1999 J. Biol. Chem. 274(50):35596-35600. O gene correspondente pode ser identificado utilizando técnicas padrão, tal como sequenciação N-terminal e Southern *blotting* utilizando uma sonda de ADN degenerada. O gene intacto pode então ser expresso num microrganismo hospedeiro que expressa também uma fucosiltransferase.

### Exemplo 7: Método de manipulação de estirpes para exprimir transportador UDP-galactose

O transportador de UDP-galactose (UDP-Gal) humano foi clonado e revelou estar activo em *S. cerevisiae*. (Kainuma, M., et al 1999 Glycobiology 9(2): 133-141). Um segundo transportador de UDP-galactose humano (hUGT1) foi clonado e expressado de modo funcional em células do ovário de hamster chinês. Aoki, K., et al. 1999 J.Biochem. 126(5): 940-950. Do mesmo modo Segawa e colaboradores clonaram um transportador UDP-galactose de *Schizosaccharomyces pombe* (Segawa, H., et al. 1999 Febs Letters 451(3): 295-298).

### Transportador de CMP-ácido siálico

O transportador de CMP-ácido siálico humano (hCST) foi clonado e expesso em células Lee 8 CHO por Aoki e colaboradores (1999). A clonagem molecular do transportador CMP-ácido siálico de hamster foi também atingida (Eckhardt and Gerardy Schahn 1997 Eur. J. Biochem 248(1): 187-192). A expressão funcional do transportador CMP-ácido siálico de murino foi conseguida em *Saccharomyces cerevisiae* por Berninsone, P., et al. 1997 J. Biol. Chem. 272(19): 12616-12619.

### Quadro 6 Exemplos de formas de realização preferidas dos métodos para a modificação de glicosilação num microrganismo eucariota, por exemplo *Pichia pastoris*

Estrutura desejada	Activi dades catalí ticas adequa	Fontes adequadas de sequências de	Deleções genéticas adequadas	Transportadores e/ou fosfatases adequados
--------------------	--	---	------------------------------------	---

	das	localizaçã o		
Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	α-1,2- manosidase ( <i>Bacillus</i> <i>sp.</i> , <i>A.</i> <i>nidulans</i> , murino, humano)	Mns1 (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ) <i>Och1</i> (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>P.</i> <i>pastoris</i> ) <i>Ktr1</i> <i>Mnn9</i> <i>Mnt1</i> ( <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ) KDEL, HDEL (C- terminal)	OCH1 MNN4 MNN6	nenhum
GlcNAcMan <sub>5</sub> Glc NAc <sub>2</sub>	GlcNAc Transferase I, (humano, murino, rato, etc.)	<i>Och1</i> (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>P.</i> <i>pastoris</i> ) <i>KTR1</i> (N- terminal) KDEL, HDEL (C- terminal) <i>Mnn1</i> (N- terminus, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ) <i>Mnt1</i> (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ) GDPase (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> )	OCH1 MNN4 MNN6	Transport ador UDP- GlcNAc (humano, murino, <i>K</i> <i>lactis</i> ) <i>UDPase</i> (humano)
GlcNAcMan <sub>3</sub> Glc NAc <sub>2</sub>	manosidase II	<i>Ktr1</i> <i>Mna1</i> (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ) <i>Mnt1</i> (N- terminal, <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ) <i>Kre2/Mnt1</i> ( <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> )	OCH1 MNN4 MNN6	Transport ador UDP- GlcNAc (humano, murino, <i>K</i> <i>lactis</i> ) <i>UDPase</i> (humano)

		Kre2 ( <i>P. pastoris</i> ) Ktr1 <i>S. cerevisiae</i> ) Ktr1 ( <i>P. pastoris</i> ) Mnn1 ( <i>S. cerevisiae</i> )		
GlcNAc <sub>(2-4)</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	GlcNAc Transferase II, III, IV, V (humano, murino)	Mnn1 (N-terminal, <i>S. cerevisiae</i> ) Mnt1 (N-terminal, <i>S. cerevisiae</i> ) Kre2/Mnt1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) Kre2 ( <i>P. pastoris</i> ) Ktr1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) Ktr1 ( <i>S. pastoris</i> ) Mnn1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	OCH1 MNN4 MNN6	transportador UDP-GlcNAc (humano, murino, <i>K. lactis</i> ) UDPase (humano)
Gal <sub>(1-4)</sub> GlcNAc <sub>(2-4)</sub> -Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	$\beta$ -1,4-Galactosil transferase (humano)	Mnn1 (N-terminal, <i>S. cerevisiae</i> ) Mnt1 (N-terminal, <i>S. cerevisiae</i> ) Kre2/Mnt1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) Kre2 ( <i>P. pastoris</i> ) Ktr1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) Ktr1 ( <i>P. pastoris</i> ) Mnn1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	OCH1 MNN4 MNN6	Transportador UDP-Galactose (humano, <i>S. pombe</i> )
NANA <sub>(1-4)</sub> -Gal <sub>(1-4)</sub> GlcNAc <sub>(2-4)</sub> -Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	$\alpha$ -2,6-Sialiltransferase (humano) $\alpha$ -2,3-Sialiltrans	KTR1 MNN1 (N-terminal, <i>S. cerevisiae</i> ) MNT1 (N-terminal,	OCH1 MNN4 MNN6	Transportador CMP-ácido siálico (humano)

fer *S. ase cerevisiae*)  
 Kre2/Mnt1  
 (*S.*  
*cerevisiae*)  
 Kre2 (*P.*  
*pastoris*)  
 Ktr1 (*S.*  
*cerevisiae*)  
 Ktr1 (*P.*  
*pastoris*)  
 MNN1 (*S.*  
*cerevisiae*)

#### Quadro 7: Recursos de sequências de ADN e proteína

---

1. European Bioinformatics Institute (EBI) é um centro de investigação e serviços em bioinformática: <http://www.ebi.ac.uk/>

2. Base de dados Swissprot: <http://www.expasy.ch/spr>

3. Lista de glicosiltransferases conhecidas e respectiva origem.

$\beta$ 1,2(GnT I) EC 2.4.1.101

---

4. cADN humano, Kumar et al (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9948-9952

5. gene humano, Hull et al (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:608-615

6. cADN de ratinho, Kumar et al (1992) Glycobiology 2:383-393

7. gene de ratinho, Pownall et al (1992) Genomics 12:699-704

8. gene de murino (flanqueia 5', não codificador), Yang et al (1994) Glycobiology 5:703-712

9. cADN de coelho, Sarkar et al (1991) Proc. Natl. Acad.

---

---

Sci. USA 88:234- 238

10. cADN de rato, Fukada et al (1994) Biosci.Biotechnol.Biochem. 58:200-201

1,2 (GnT II) EC 2.4.1.143

---

11. gene humano, Tan et al (1995) Eur. J. Biochem. 231:317-328

12. cADN de rato, D'Agostaro et al (1995) J. Biol. Chem. 270:15211-15221

13.  $\beta$ 1,4 (GnT III) EC 2.4.1.144

14. cADN humano, Ihara et al (1993) J. Biochem.113:692-698

15. gene de murino, Bhaumik et al (1995) Gene 164:295-300

16. cADNA rato, Nishikawa et al (1992) J. Biol. Chem. 267:18199-18204

---

$\beta$ 1,4 (GnT IV EC 2.4.1.145

---

17. cADN humano, Yoshida et al (1998) Glycoconjugate Journal 15:1115-1123

18. cADN de bovino, Minowa et al., Patente Europeia EP 0 905 232  $\beta$ 1,6 (GnT V) EC 2.4.1.155

19. cADN humano, Saito et al (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 198:318-327

20. cADN de rato, Shoreibah et al (1993) J. Biol. Chem. 268:15381-15385

$\beta$ 1.4 Galactosiltransferase, EC 2.4.1.90 (LacNAc sintetase)  
EC

---

2.4.1.22 (lactose sintetase )

---

- 
21. cADN de bovino, D'Agostaro et al (1989) Eur. J. Biochem. 183:211-217
  22. cADN de bovino (parcial), Narimatsu et al (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4720-4724
  23. cADN de bovino (parcial), Masibay & Qasba (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5733-5377
  24. cADN de bovino (5' terminal), Russo et al (1990) J. Biol. Chem. 265:3324
  25. cADN de galinha (parcial), Ghosh et al (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 1215-1222
  26. cADN humano, Masri et al (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:657-663
  27. cADN humano, (HeLa cells) Watzele & Berger (1990) Nucl. Acids Res. 18:7174
  28. cADN humano, (parcial) Uejima et al (1992) Cancer Res. 52:6158-6163
  29. cADN humano, (carcinoma) Appert et al (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 139:163-168
  30. gene humano, Mengle-Gaw et al (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:1269-1276
  31. cADN de murino, Nakazawa et al (1988) J. Biochem. 104:165-168
  32. cADN de murino, Shaper et al (1988) J. Biol Chem. 263:10420-10428
  33. cADN de murino(novo), Uehara & Muramatsu unpublished
  34. gene de murino, Hollis et al (1989) Biochem Biophys. Res. Commun. 162:1069-1075
-

- 
35. proteína de rato (parcial), Bendiak et al (1993) Eur. J. Biochem. 216:405-417
- 2,3-Sialiltransferase. (ST3Gal II) (N-ligado) (Gal-1,3/4-GlcNAc) EC 2.4.99.6
- 
38. galinha, Kurosawa et al (1994) Eur. J. Biochem 219:375-381
39. cADN humano (parcial), Lance et al (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun.164:225- 232
40. cADN humano, Grundmann et al (1990) Nucl. Acids Res. 18:667
41. cADN humano, Zettlmeisl et al (1992) Patent EPO475354-A/3
42. cADN humano, Stamenkovic et al (1990) J. Exp. Med. 172:641-643 (CD75)
43. cADN humano, Bast et al (1992) J. Cell Biol. 116:423-435
44. gene humano (parcial), Wang et al (1993) J. Biol. Chem. 268:4355-4361
45. gene humano (5' flanco), Aasheim et al (1993) Eur. J. Biochem. 213:467-475
46. gene humano (promotor), Aas-Eng et al (1995) Biochim. Biophys. Acta 1261:166-169
47. cADN de ratinho, Hamamoto et al (1993) Bioorg. Med. Chem.1:141-145
48. cADN de rato, Weinstein et al (1987) J. Biol Chem. 262:17735-17743
49. cADN de rato (fragmentos de transcrição), Wang et al
-



---

(1991) Glycobiology 1:25-31, Wang et al (1990) J. Biol. Chem. 265: 17849-17853

50. cADN de rato (5' terminal), O'Hanlon et al (1989) J. Biol. Chem. 264:17389-17394; Wang et al (1991) Glycobiology 1:25-31

51. gene de rato (promotor), Svensson et al (1990) J. Biol. Chem. 265:20863-20688

52. mARN de rato (fragmento), Wen et al (1992) J. Biol. Chem. 267:2512-2518

---

São descritos métodos e reagentes que podem ser utilizados nos métodos para a modificação da glicosilação na literatura, tal como patente norte-americana nº5,955,422, patente norte-americana nº4,775,622, patente norte-americana nº6,017,743, patente norte-americana nº4,925,796, patente norte-americana nº5,766,910, patente norte-americana nº5,834,251, patente norte-americana nº5,910,570, patente norte-americana nº5,849,904, patente norte-americana nº5,955,347, patente norte-americana nº5,962,294, patente norte-americana nº5,135,854, patente norte-americana nº4,935,349, patente norte-americana nº5,707,828, and patente norte-americana nº5,047,335.

Podem ser obtidos sistemas de expressão de leveduras a partir de fontes tal como a American Type Culture Collection, Rockville, MD. Os vectores encontram-se disponíveis no comércio a partir de uma variedade de fontes.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Gerngross, Tillman U.

<120> MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS MODIFICADAS

<130> GFI 100

<140> 09/892,591

<141> 2001-06-27

<150> 60/214,358

<151> 2000-06-28

<150> 60/215,638

<151> 2000-06-30

<150> 60/279,997

<151> 2001-03-30

<160> 6

<170> Patenteln versão 3,1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador A para gene alvo em *P.pastoris* (1,6-manosiltransferase)

<400> 1

atggcgaagg cagatggcag t 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador B para gene alvo em *P.pastoris* (1,6-manosiltransferase)

<400> 2

ttagtccttc caacttcctt c 21

<210> 3

<211>26

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador A para gene alvo em *P.pastoris* (1,2-manosiltransferases)

<220>

<221> característica-mista

<222> (3).. (3)

<223> em que "n" é igual a "c" ou "t"

<220>

<221> característica-mista

<222> (7).. (7)

<223> em que "n" é igual a "c" ou "t"

<220>

<221> característica mista

<222> (9)..(9)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "t" ou "g" ou "c".

<220>

<221> característica-mista

<222> (12)..(12)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "t" ou "g" ou "c".

<220>

<221> característica-mista

<222> (15)..(15)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "g".

<220>

<221> característica-mista

<222> (17)..(17)

<223> em que "n" é igual a "c" ou "f".

<220>

<221> característica-mista

<222> (18)..(18)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "t" ou "c" ou "g".

<220>

<221> característica mista

<222> (21)..(21)

<223> em que "n" é igual a "c" ou "t".

<220>

<221> característica-mista

<222> (24)..(24)

<223> em que "n" é igual a "c" ou "t".

<400> 3

tantggngng tngancnnga natnaa 26

<210> 4

<211>20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para gene alvo em *P.pastoris* (1,2-manosiltransferases).

<220>

<221> característica-mista

<222> (3).. (3)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "g".

<220>

<221> característica-mista

<222> (6)..(6)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "t" ou "g" ou "c".

<220>

<221> característica-mista

<222> (12)..(12)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "t" ou "g" ou "c".

<220>

<221> característica-mista

<222> (14)..(14)

<223> em que "n" é igual a "g" ou "t".

<220>

<221> característica-mista

<222> (15)..(15)

<223> em que "n" é igual a "c" ou "t".

<220>

<221> característica-mista

<222> (18)..(18)

<223> em que "n" é igual a "a" ou "g".

<400> 4

gcntcncccc ancnnntcnta 20

<210> 5

<211>4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Tetrapeptídeo de sinal

<400> 5

His Asp Glu Leu 1

<210>6

<211>4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Tetrapeptídeo de sinal

<400> 6

Lys Asp Glu Leu

1

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

A lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor, não sendo parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- JP 8336387 A [0023]
- EP 1211311 A1 [0025]
- US 5834251 A, Maras and Contreras [0027] [0038]  
[0082]
- US 5595900 A [0044] [0069]
- EP 1211310 A1 [0053]
- EP 0905232 A [0081]
- EP 0475354A3 A, Zettlmeisl [0081]
- US 5955422 A [0082]
- US 4775622 A [0082]
- US 6017743 A [0082]
- US 4925796 A [0082]
- US 5766910 A [0082]
- US 5910570 A [0082]
- US 5849904 A [0082]
- US 5955347 A [0082]
- US 5962294 A [0082]
- US 5135854 A [0082]



- US 4935349 A [0082]
- US 5707828 A [0082]
- US 5047335 A [0082]
- US 09892591 B [0084]
- US 60214358 B [0084]
- US 60215638 B [0084]
- US 60279997 B [0084]

**Literatura não relacionada com patentes referida na descrição**

- **Moens ; Vanderleyden.** *Arch. Microbiol.*, 1997, vol. 168 (3), 169-175 [0001]
- **R.K. Bretthauer et al.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, vol. 30, 193-200 [0003]
- **W. Martinet et al.** *Biotechnology Letters*, 1998, vol. 20, 1171-1177 [0003]
- **S. Weikert et al.** *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 1116-1121 [0003] [0014]
- **M. Malissard et al.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, vol. 267, 169-173 [0003]
- **Jarvis et al.** Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, vol. 9, 528-533 [0003]
- **M. Takeuchi.** *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 1997, vol. 9, S29-S35 [0003]
- **Sommers ; Hirschberg.** *J. Cell Biol.*, 1981, vol. 91 (2), A406-A406 [0006]
- **Sommers ; Hirschberg.** *J. Biol. Chem.*, vol. 257 (18), 811-817 [0006]

- **Perez ; Hirschberg.** *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 138, 709-715 [0006]
- **Beminsone et al.** *J. BioL Chem.*, 1994, vol. 269 (1), 207-211 [0007]
- **Berninsone, P. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270 (24), 14564-14567 [0007] • **Beaudet, L. et al.** *Abc Transporters: Biochemical, Cellular, and Molecular Aspects*, 1998, vol. 292, 397-413 [0007]
- **Schwientek et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270 (10), 5483-5489 [0009]
- **Eades ; Hintz.** *Gene*, 2000, vol. 255 (1), 25-34 [0010]
- *Arzneimittelforschung*, August 1998, vol. 48 (8), 870-880 [0013]
- *Dente Prog. Clin. BioL 1989 Res.*, 1989, vol. 300, 85-98 [0013]
- **Ruther et al.** *Cell*, 1988, vol. 53 (6), 847-856 [0013]
- **Ware, J. et al.** *Thrombosis and Haemostasis*, 1993, vol. 69 (6), 1194-1194 [0013]
- **Cole, E. S. et al.** *J. Cell. Biochem*, 1994, 265-265 [0013]
- **Staub et al.** *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18 (3), 333-338 [0013]
- **McGarvey, P. B. et al.** *Bio-Technology*, 1995, vol. 13 (13), 1484-1487 [0013]
- **Bardor, M. et al.** *Trends in Plant Science*, 1999, vol. 4 (9), 376-380 [0013]
- **Altmans et al.** *Glycoconj. J.*, 1999, vol. 16 (2), 109-123 [0013]
- **Raju et al.** *Annals Biochem.*, 2000, vol. 283 (2), 123-132 [0014]
- **Werner ; Noe et al.** *Arzneimittelforschung*, 1998, vol. 48 (8), 870-880 [0014]

- **Andersen ; Goochee.** *Cur. Opin.Biotechnol.*, 1994, vol. 5, 546-549 [0014]
- **Yang ; Butler.** *Biotechnol.Bioengin*, 2000, vol. 68 (4), 370-380 [0014]
- **Altmann ; Marz et al.** *Glycoconj. J.*, 1995, vol. 12 (2), 150-155 [0018]
- **Kalsner et al.** *Glycoconj. J.*, 1995, vol. 12 (3), 360-370 [0021]
- **Graham ; Emr.** *J. Cell. Biol.*, 1991, vol. 114 (2), 207-218 [0022]
- **Yoko-o et al.** *FEBS Lett.*, 2001, vol. 489 (1), 75-80 [0022]
- **Nakanishi-Shindo et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268 (35), 26338-26345 [0022]
- **Chiba et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 26298-26304 [0022]
- **Martinet et al.** *Biotechnol. Lett.*, 1998, vol. 20 (12), 1171-1177 [0024]
- **Cereghino, J. L. ; J. M. Cregg.** *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, vol. 24 (1), 45-66 [0039]
- **Harkki, A. et al.** *Bio-Technology*, 1989, vol. 7 (6), 596 [0039]
- **Berka, R M. et al.** *Abstr.Papers Amer. Chem.Soc.*, 1992, vol. 203, 121 [0039]
- **Svetina, M. et al.** *J.Biotechnol.*, 2000, vol. 76 (2-3), 245-251 [0039]
- **R- Rothsteins.** *Methods in Enzymology*, 1991, vol. 194 [0048]
- **Ichishima et al.** *Biochem. J.*, 1999, vol. 339, 589-597 [0051]

- **Maras et al.** *J. Biotechnol.*, 2000, vol. 77 (2- 3), 255-263 [0051]
- **Yoshida et al.** *Biochem. J.*, 1993, vol. 290, 349-354 [0051]
- **Ren et al.** *Biochem.*, 1995, vol. 34 (8), 2489-2495 [0051]
- **Chandrasekaran et al.** *Cancer Res.*, 1984, vol. 44 (9), 4059-68 [0051]
- **Schneikert ; Herscovics.** *Glycobiology*, 1994, vol. 4 (4), 445-50 [0051]
- **Maruyama et al.** *Carbohydrate Res.*, 1994, vol. 251, 89-98 [0051]
- **Romero et al.** *Biochem. J.*, 1997, vol. 321 (2), 289-295 [0053]
- **Lehele ; Tanner.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, vol. 350 (1), 225-235 [0053]
- **Guillen et al.** *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95 (14), 7888-7892 [0069]
- **Schachter.** *Glycobiology*, 1991, vol. 1 (5), 453-461 [0074]
- **Ishida, N. et al.** *J. Biochem.*, 1999, vol. 126 (1), 68-77 [0078]
- **Puglielli, L. ; C. B. Hirschberg.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274 (50), 35596-35600 [0079]
- **Kainuma, M. et al.** *Glycobiology*, 1999, vol. 9 (2), 133-141 [0080]
- **Aoki, K. et al.** *J.Biochem.*, 1999, vol. 126 (5), 940-950 [0080]
- **Segawa, H. et al.** *Febs Letters*, 1999, vol. 451 (3), 295-298 [0080]
- **Eckhardt ; Gerardy Schahn.** *Eur. J. Biochem*, 1997, vol. 248 (1), 187-192 [0081]

- **Berninsone, P. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (19), 12616-12619 [0081]
- **Kumar et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 9948-9952 [0081]
- **Hull et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 176, 608-615 [0081]
- **Kumar et al.** *Glycobiology*, 1992, vol. 2, 383-393 [0081]
- **Pownall et al.** *Genomics*, 1992, vol. 12, 699-704 [0081]
- **Yang et al.** *Glycobiology*, 1994, vol. 5, 703-712 [0081]
- **Sarkar et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 234-238 [0081]
- **Fukada et al.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994, vol. 58, 200-201 [0081]
- **Tan et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 231, 317-328 [0081]
- **D'Agostaro et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 15211-15221 [0081]
- **Ihara et al.** *J. Biochem.*, 1993, vol. 113, 692-698 [0081]
- **Bhaumik et al.** *Gene*, 1995, vol. 164, 295-300 [0081]
- **Nishikawa et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 18199-18204 [0081]
- **Yoshida et al.** *Glycoconjugate Journal*, 1998, vol. 15, 1115-1123 [0081]
- **Saito et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, vol. 198, 318-327 [0081]
- **Shoreibah et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 15381-15385 [0081]
- **D'Agostaro et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 183, 211-217 [0081]
- **Narimatsu et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 4720-4724 [0081]

- **Masibay ; Qasba.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 5733-5377 [0081]
- **Russo et al.** *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 3324 [0081]
- **Ghosh et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 1215-1222 [0081]
- **Masri et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, vol. 157, 657-663 [0081]
- **Watzele ; Berger.** *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 7174 [0081]
- **Uejima et al.** *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 6158-6163 [0081]
- **Appert et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, vol. 139, 163-168 [0081]
- **Mengle-Gaw et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 176, 1269-1276 [0081]
- **Nakazawa et al.** *J. Biochem.*, 1988, vol. 104, 165-168 [0081]
- **Shaper et al.** *J. BioL Chem.*, 1988, vol. 263, 10420-10428 [0081]
- **Hollis et al.** *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 162, 1069-1075 [0081]
- **Bendiak et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 216, 405-417 [0081]
- **Kitagawa ; Paulson.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 194, 375-382 [0081]
- **Wen et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 21011-21019 [0081]
- **Kurosawa et al.** *Eur. J. Biochem*, 1994, vol. 219, 375-381 [0081]
- **Lance et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 164, 225-232 [0081]

- Grundmann et al. *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 667 [0081]
- Stamenkovic et al. *J. Exp. Med.*, 1990, vol. 172, 641-643 [0081]
- Bast et al. *J. Cell Biol.*, 1992, vol. 116, 423-435 [0081]
- Wanget al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 4355-4361 [0081]
- Aasheim et al. *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 213, 467-475 [0081]
- Aas-Eng et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, vol. 1261, 166-169 [0081]
- Hamamoto et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 1993, vol. 1, 141-145 [0081]
- Weinstein et al. *J. Biol Chem.*, 1987, vol. 262, 17735-17743 [0081]
- Wang et al. *Glycobiology*, 1991, vol. 1, 25-31 [0081]
- Wang et al. *J. Biol Chem.*, 1990, vol. 265, 17849-17853 [0081]
- O'Hanlon et al. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 17389-17394 [0081]
- Svensson et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 20863-20868 [0081]
- Wen et al. *J. Biol Chem.*, 1992, vol. 267, 2512-2518 [0081]

**REIVINDICAÇÕES**

1. Método de rastreio de uma biblioteca para detectar uma célula hospedeira capaz de produzir uma glicoproteína alvo com um excesso de 30 % em mole de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , compreendendo o método mencionado as seguintes etapas:

- (a) fornecimento de uma célula hospedeira unicelular ou fúngica filamentosa, que não apresente actividade da alfa-1,6-manosiltransferase em relação ao N-glicano na glicoproteína alvo;
- (b) introdução de um gene na célula hospedeira mencionada, gene esse que codifica uma enzima híbrida compreendendo um domínio catalítico alfa-1,2-manosidase fundido a um peptídeo de sinal N-terminal celular que endereça e ancora o domínio catalítico mencionado ao RE ou aparelho de Golgi e
- (c) determinação do nível de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  na proteína alvo.

2. Método da reivindicação 1, incluindo ainda:

- (i) introdução de um gene na célula hospedeira mencionada, gene esse que codifica uma enzima híbrida compreendendo um domínio catalítico GnT I fundido a um peptídeo de sinal N-terminal celular, que o endereça e ancora ao RE ou aparelho de Golgi mencionado e
- (ii) determinação do nível de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  convertido pelo GnT I em  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ .



3. Método da reivindicação 1 ou 2, incluindo ainda a introdução de um gene ou mais genes na célula hospedeira mencionada, gene esse que codifica uma enzima híbrida compreendendo um domínio catalítico manosidase, glicosiltransferase ou glicosidase fundido a um peptídeo de sinal N-terminal celular, que o endereça e ancora ao RE ou aparelho de Golgi mencionado.
4. Método da reivindicação 3, em que o domínio catalítico glicosiltransferase é seleccionado do grupo constituído por GnT II, GnT III, GnT IV, GnT V, GnT VI, Galt, fucosiltransferase e sialiltransferase.
5. Método da reivindicação 3, em que a manosidase é uma manosidase II.
6. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, incluindo ainda a introdução de um gene na célula hospedeira mencionada, que codifica transportadores de açúcares-nucleotídeos ou nucleotídeos difosfatases.
7. Método da reivindicação 6, em que o transportador de açúcares-nucleotídeos é seleccionado do grupo constituído por transportador de UDP-GlcNAc, transportador de UDP galactose, transportador de GDP fucose e transportador de CMP-ácido siálico.
8. Método da reivindicação 6, em que o nucleotídeo difosfatase é uma difosfatase específica de UDP ou GDP.

9. Célula hospedeira passível de ser obtida pelo método de qualquer uma das reivindicações 1 a 8.
10. Célula hospedeira que é um fungo unicelular ou filamentoso que
  - (a) não revela actividade alfa-1,6 manosiltransferase em relação ao N-glicano numa glicoproteína e
  - (b) possui no seu retículo endoplasmático (RE) ou aparelho de Golgi uma enzima híbrida seleccionada por ter uma actividade óptima no RE ou Golgi, compreendendo:
    - (ba) um domínio catalítico alfa-1,2 manosidase fundido a
    - (bb) um peptídeo de sinal quimérico de endereçamento N-terminal, celular para o domínio catalítico de (ba) que está endereçado e ancora o domínio catalítico de (ba) ao RE ou aparelho de Golgi mencionado.
11. Célula hospedeira da reivindicação 10 que inclui ainda
  - (c) no seu RE ou aparelho de Golgi uma enzima híbrida seleccionada por ter uma actividade óptima no RE ou Golgi, compreendendo:
    - (ca) um domínio catalítico GnT I fundido a
    - (cb) um peptídeo de sinal quimérico de endereçamento N-terminal, celular para o domínio catalítico de (ca) que está endereçado e ancora o domínio catalítico de (ca) ao RE ou Golgi mencionado.

12. Célula hospedeira da reivindicação 10, em que os domínios catalíticos alfa-1,2-manosidase possuem uma actividade óptima no RE ou Golgi e um pH entre 5,1 e 8,0.
13. Célula hospedeira da reivindicação 12, em que o domínio catalítico alfa-1,2-manosidase possui uma actividade óptima a um pH entre 5,9 e 7,5.
14. Célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 10 a 13, expressando ainda uma ou várias enzimas híbridas, incluindo um domínio catalítico manosidase, glicosiltransferase ou glicosidase fundido a um peptídeo de sinal N-terminal celular que o endereça e ancora ao RE ou aparelho de Golgi mencionado.
15. Célula hospedeira da reivindicação 14, em que o domínio catalítico glicosiltransferase é seleccionado do grupo constituído por GnT II, GnT III, GnT IV, GnT V, GnT VI, GalT, fucosiltransferase e sialiltransferase.
16. Célula hospedeira da reivindicação 14, em que a manosidase é uma manosidase II.
17. Célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 10 a 16 que expressa ainda transportadores de açúcares - nucleotídeos ou nucleotídeos difosfatases.
18. Célula hospedeira da reivindicação 17, em que o transportador de açúcares-nucleotídeos é seleccionado do grupo constituído por transportador de UDP-GlcNAc,

transportador de UDP galactose, transportador de GDP fucose e transportador de CMP-ácido siálico.

19. Célula hospedeira da reivindicação 17, em que o nucleotídeo difosfatase é uma difosfatase específica de UDP ou GDP.
20. Célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 10 a 19, que é ainda deficiente na actividade de uma ou mais das enzimas seleccionadas do grupo constituído por manosiltransferases e fosfomanosiltransferases.
21. Célula hospedeira da reivindicação 20, que adicionalmente não expressa uma enzima seleccionada do grupo constituído por 1,6-manosiltransferase, 1,3-manosiltransferase e 1,2-manosiltransferase.
22. Método para a produção de uma glicoproteína recombinante contendo:
  - (a) introdução de um ácido nucleico que codifica a glicoproteína recombinante numa célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 9 a 21,
  - (b) expressão do ácido nucleico na célula hospedeira para produzir a glicoproteína e
  - (c) isolamento da glicoproteína recombinante a partir da célula hospedeira.

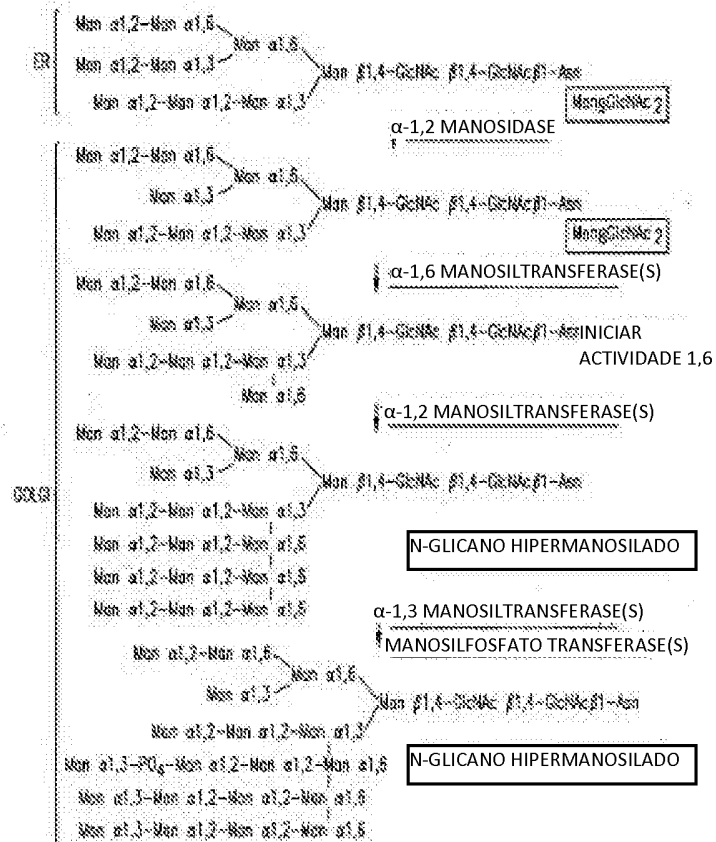


FIG. 1A

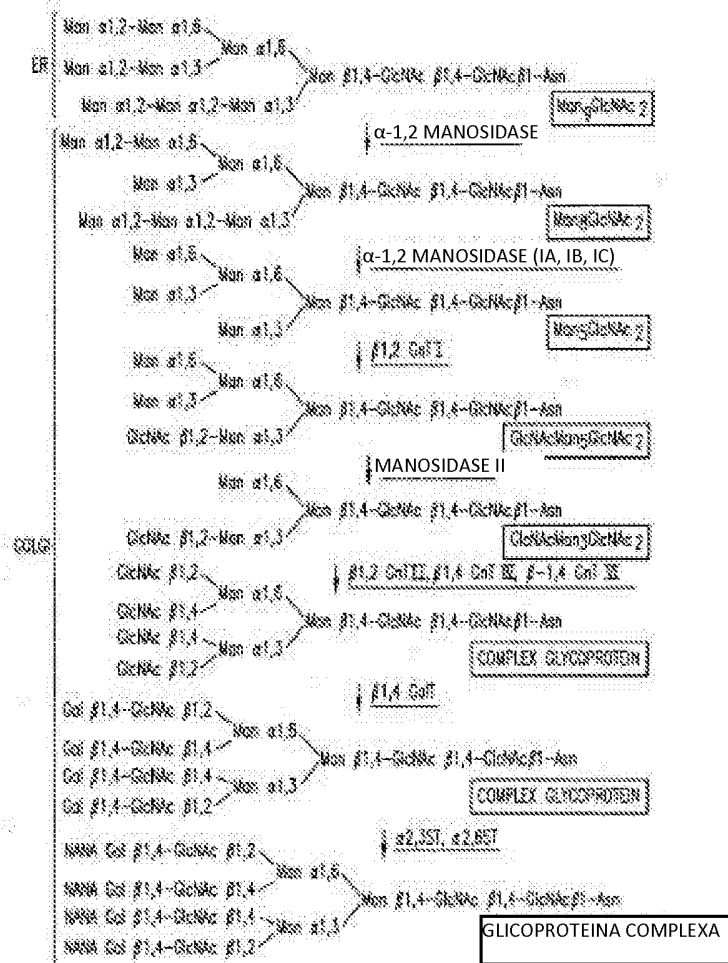


FIG. 1B