

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

(22) Data de pedido: **1993.11.30**

(30) Prioridade(s): **1992.11.30 US 983451**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.04.14**
103/2010

(73) Titular(es):

**MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE NEW
YORK UNIVERSITY**

**ONE GUSTAVE LEVY PLACE NEW YORK, NY
1029-6574**

US

(72) Inventor(es):

ROBERT J. DESNICK

US

DAVID F. BISHOP

US

YIANNIS A. IOANNOU

US

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS SEGREGADAS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Método para produção de proteínas segregadas"

1. INTRODUÇÃO

A presente invenção refere-se à produção de α -Galactosidase (α -Gal A) α 2,6-sialilada humana contendo manose-6-fosfato, biologicamente activa, envolvendo a clonagem e a expressão da sequência de codificação genética para α -Gal A num sistema de expressão em mamífero que proporciona as modificações e processamento após a tradução correctos do produto de expressão.

A invenção é aqui demonstrada através de exemplos de trabalho em que foram produzidos níveis elevados de α -Gal A α 2,6-sialilada contendo manose-6-fosfato em sistemas de expressão em mamífero. A enzima α -Gal produzida de acordo com a invenção pode ser utilizada para uma variedade de finalidades, incluindo, mas não se lhes limitando, terapia de substituição enzimática para a Doença de Fabry, processos industriais que envolvem a hidrólise de resíduos α -D-galactosilo de glicoconjugados, e para a conversão do antigénio de grupo sanguíneo B em eritrócitos no antigénio de grupo sanguíneo O.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

No início da década de 1970, vários investigadores demonstraram a existência de duas isozimas de α -Galactosidase designadas A e B, que hidrolisavam as ligações α -galactosídicas em 4-MU- e/ou p-NP- α -D-galactopiranósidos (Kint, 1971, *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 79: 633-644; Beutler & Kuhl, 1972, *Amer. J. Hum. Genet.* 24: 237-249; Romeo, et al., 1972, *FEBS Lett.* 27: 161-166; Wood & Nadler, 1972, *Am. J. Hum. Genet.* 24: 250-255; Ho, et al., 1972, *Am. J. Hum. Genet.* 24: 256-266; Desnick, et al, 1973, *J. Lab. Clin. Med.* 81: 157-171; e Desnick, et al, 1989, em "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Scriver, C.R., Beaudet, A.L. Sly, W.S. and Valle, D., eds., p. 1751-1796, McGraw Hill, New York). Em tecidos, cerca de 80%-90% da actividade total de α -Galactosidase

(α -Gal) era devida a uma isozima de α -Gal A termolábil, inibível por mioinositol, enquanto uma α -Gal B relativamente termostável, era responsável pela restante. As duas "isozimas" eram separáveis por electroforese, focagem isoeléctrica e cromatografia de permuta iónica. Após tratamento com neuraminidase, as migrações electroforéticas e o valor de pI das α -Gal A e B eram semelhantes (Kint, 1971; *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 79: 633-644), inicialmente sugerindo que as duas enzimas eram os produtos diferentemente glicosilados do mesmo gene. A verificação de que as enzimas de glicoproteínas purificadas tinham propriedades físicas semelhantes, incluindo o peso molecular das subunidades (~46 kDa), estruturas homodiméricas, e as composições de aminoácidos também indicaram as suas relações estruturais (Beutler & Kuhl, 1972, *J. Biol. Chem.* 247: 7195-7200; Callahan, et al., 1973, *Biochem. Med.* 7: 424-431; Dean, et al., 1977, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 77: 1411-1417; Schram, et al., 1977, *Biochim. Biophys. Acta.* 482: 138-144; Kusiak, et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 184-190; Dean, et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 10001-10005; e Bishop, et al., 1980, em "Enzyme Therapy in Genetic Disease: 2", Desnick, R.J., ed., p. 17-32, Alan R. Liss, Inc., New York). Contudo, a demonstração subsequente de que anticorpos policlonais contra α -Gal A ou B não reagiam de modo cruzado com a outra enzima (Beutler & Kuhl, 1972, *J. Biol. Chem.* 247: 7195-7200; e Schram, et al., 1977, *Biochim. Biophys. Acta.* 482: 138-144); que apenas a actividade de α -Gal A era deficitária em hemizigotas com doença de Fabry (Kint, 1971; *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 79: 633-644; Beutler & Kuhl, 1972, *Amer. J. Hum. Genet.* 24: 237-249; Romeo, et al., 1972, *FEBS Lett.* 27: 161-166; Wood & Nadler, 1972, *Am. J. Hum. Genet.* 24: 250-255; Ho, et al., 1972, *Am. J. Hum. Genet.* 24: 256-266; Desnick, et al., 1973, *J. Lab. Clin. Med.* 81: 157-171; Desnick, et al., 1989, em "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Scriver, C.R., Beaudet, A.L. Sly, W.S. and Valle, D., eds, p. 1751-1796, McGraw Hill, New York; e, Beutler & Kuhl, 1972, *J. Biol. Chem.* 247: 7195-7200); e que os genes para α -Gal A e B se mapeavam em diferentes cromossomas (Desnick, et al., 1989, em "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Scriver, C.R., Beaudet, A.L. Sly, W.S. and Valle, D., eds, p. 1751-1796, McGraw Hill, New York; deGroot, et al., 1978, *Hum. Genet.* 44: 305-312), demonstraram claramente que estas enzimas eram geneticamente distintas.

2.1 α -GAL A E A DOENÇA DE FABRY

Na doença de Fabry, uma doença de armazenamento lisossómico que resulta da actividade deficiente de α -Gal A, a identificação do defeito enzimático em 1967 (Brady, et al., 1967, *N. Eng. J. Med.* 276: 1163) conduziu aos primeiros ensaios terapêuticos *in vitro* (Dawson, et al., 1973, *Pediat. Res.* 7: 694-690m) e *in vivo* (Mapes, et al., 1970, *Science* 169: 987) de substituição da α -Gal A em 1969 e 1970, respectivamente. Estes e subsequentes ensaios (Mapes, et al., 1970, *Science* 169: 987; Desnick, et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5326; e, Brady, et al., 1973, *N. Engl. J. Med.* 289: 9) demonstraram a eficácia bioquímica da substituição enzimática directa para esta doença. Injecções repetidas de α -Gal A plasmática e esplénica purificada (100 000 U/injecção) foram administradas a hemizigotas afectados ao longo de um período de quatro meses (Desnick, et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5326). Os resultados destes estudos demonstraram que (a) a depuração do plasma da forma esplénica foi 7 vezes mais rápida do que a da forma plasmática (10 min vs 70 min); (b) em comparação com a forma esplénica da enzima, a forma plasmática realizou uma depleção 25 vezes superior do substrato no plasma ao longo de um período marcadamente mais longo (48 horas vs 1 hora); (c) não houve evidência de uma resposta imunológica a seis doses de qualquer das formas, administradas intravenosamente ao longo de um período de quatro meses a dois hemizigotas afectados; e (d) se obteve evidência sugestiva que indicava que substrato armazenado no tecido era mobilizado para a circulação após a depleção pela forma plasmática, mas não pela forma esplénica da enzima. Assim, a enzima administrada não apenas efectuou a depleção do substrato da circulação (um local principal de acumulação), como possivelmente também mobilizou o substrato previamente armazenado a partir de outros depósitos para a circulação para subsequente depuração. Estes estudos indicaram o potencial para a eliminação, ou redução significativa, da armazenagem patológica de glicolípidos por substituição repetida da enzima.

Contudo, a eficácia bioquímica e clínica da substituição enzimática na doença de Fabry não foi demonstrada devido à

falta de enzima humana suficiente para uma avaliação a longo prazo com doses adequadas.

2.2 A ENZIMA α -Gal A

A enzima α -Gal A humana possui um peso molecular de aproximadamente 101 000 Da. Em electroforese em gel de SDS migra na forma de uma única banda de aproximadamente 49 000 Da, indicando que a enzima é um homodímero (Bishop & Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307). A α -Gal A é sintetizada na forma de um precursor de 50 500 Da contendo oligossacáridos sensíveis a endoglicosidase H fosforilada. Este precursor é processado numa forma madura de cerca de 46 000 Da em 3-7 dias após a sua síntese. Os intermediários deste processamento não foram definidos (Lemansky, et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 2062). Tal como com muitas enzimas lisossómicas, a α -Gal A é direccionada ao lisossoma através do receptor de manose-6-fosfato. Isto é evidenciado pela elevada taxa de secreção desta enzima em células de mucopolidose II e em fibroblastos tratados com NH_4Cl .

Mostrou-se que a enzima contém 5-15% de hidratos de carbono ligados a Asn (Ledonne, et al., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 186). Mostrou-se que a forma tissular desta enzima possuía ~52% de oligossacáridos do tipo de elevado teor de manose e 48% do tipo complexo. O tipo de elevado teor de manose co-eluiu, em cromatografia em Bio-gel, com $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}$ enquanto os oligossacáridos do tipo complexo eram de duas categorias contendo 14 e 19-39 unidades de glucose. Por focagem isoeléctrica, observaram-se muitas formas desta enzima, dependendo das fontes da enzima purificada (forma tissular vs plasmática). Contudo, por tratamento com neuraminidase, observa-se uma única banda ($\text{pI} \sim 5,1$) indicando que esta heterogeneidade se deve a diferentes graus de sialilação (Bishop & Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307). Esforços iniciais para expressar o ADNc de comprimento completo que codifica a α -Gal A envolveram a utilização de vários vectores de expressão procariotas (Hantzopoulos e Calhoun, 1987, *Gene* 57: 159; Ioannou, 1990, Tese de doutoramento, City University of New York). Apesar de se ter conseguido expressão microbiana, tal como evidenciado pelos ensaios à enzima de células intactas de *E. coli* e crescimento

em melibiose como fonte de carbono, a proteína humana foi expressa em baixos níveis e não pôde ser purificada das bactérias. Estes resultados indicam que a enzima recombinante era instável devido à falta de glicosilação normal e/ou à presença de proteases citoplasmáticas ou periplasmáticas endógenas.

2.3. ENZIMAS LISOSSÓMICAS: BIOSSÍNTESE E DIRECCIONAMENTO

As enzimas lisossômicas são sintetizadas em polissomas ligados a membranas no retículo endoplasmático rugoso. Cada proteína é sintetizada na forma de um precursor maior contendo um péptido de sinal hidrófobo no terminal amino. Este péptido interage com uma partícula de reconhecimento do sinal, uma ribonucleoproteína 11S, e inicia assim o transporte vectorial da proteína nascente através da membrana do retículo endoplasmático para o lúmen (Erickson, *et al.*, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 11224; Erickson, *et al.*, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 275; Rosenfeld, *et al.*, 1982, *J. Cell Biol.* 93: 135). As enzimas lisossômicas são glicosiladas simultaneamente com a tradução pela transferência *en bloc* de um oligossacárido grande pré-formado, glucose-3, manose-9, N-acetilglucosamina-2, de um intermediário ligado a um lípido para o resíduo Asn de uma sequência de consenso Asn-X-Ser/Thr no polipéptido nascente (Kornfeld, R. & Kornfeld, S., 1985, *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631). No retículo endoplasmático, o péptido de sinal é clivado, e o processamento do oligossacárido ligado a Asn começa pela excisão de três resíduos de glucose e um de manose da cadeia do oligossacárido.

As proteínas movem-se através de transporte vesicular, para o aparelho de Golgi onde sofrem uma variedade de modificações pós-tradução, e são classificadas para direccionamento correcto a destinos específicos: lisossomas, secreção, membrana plasmática. Durante o movimento através do Golgi, a cadeia oligossacarídica em glicoproteínas de membrana e secretórias é processada no tipo complexo contendo ácido siálico. Embora algumas das cadeias oligossacarídicas em enzimas lisossômicas sofram processamento semelhante, a maioria sofre uma série diferente de modificações. A modificação mais importante é a aquisição de resíduos

fosfomanosilo que servem como um componente essencial no processo de direccionamento destas enzimas ao lisossoma (Kaplan, *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2026). Este marcador de reconhecimento é gerado pela acção sequencial de duas enzimas do Golgi. Primeiro, a N-acetilglucosaminilfosfotransferase transfere o N-acetilglucosamina-1-fosfato do nucleótido de açúcar uridina difosfato-N-acetilglucosamina para resíduos de manose seleccionados em enzimas lisossómicas para dar origem a um intermediário fosfodiéster (Reitman & Kornfeld, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 4275; Waheed, *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 12322). Então, a N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster α -N-acetilglucosaminidase remove o resíduo N-acetilglucosamina para expor o sinal de reconhecimento, manose-6-fosfato (Varki & Kornfeld, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 9937; Waheed, *et al.*, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 5717).

Após a geração dos resíduos fosfomanosilo, as enzimas lisossómicas ligam-se a receptores de manose-6-fosfato (M-6-P) no Golgi. Deste modo as enzimas lisossómicas permanecem no espaço intracelular e segregam-se das proteínas que são destinadas a secreção. O complexo ligando-receptor sai então do Golgi através de uma vesícula revestida e é entregue numa área de adaptação pré-lisossómica onde ocorre a dissociação do ligando por acidificação do compartimento (Gonzalez-Noriega, *et al.*, 1980, *J. Cell Biol.* 85: 839). O receptor volta ao Golgi enquanto as enzimas lisossómicas são empacotadas em vesículas para formar lisossomas primários. Aproximadamente, 5-20% das enzimas lisossómicas não transitam para os lisossomas e são presumivelmente segregadas, por defeito. Uma porção destas enzimas segregadas pode ser novamente capturada pelo receptor de M-6-P que se encontra na superfície celular e ser internalizada e entregue nos lisossomas (Willingham, *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6967).

Foram identificados dois receptores de manose-6-fosfato. Uma glicoproteína de 215 kDa foi purificada a partir de uma variedade de tecidos (Sahagian, *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4289; Steiner & Rome, 1982, *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 681). A ligação deste receptor é independente de catiões bivalentes. Foi também isolado um segundo receptor de M-6-P que difere do receptor de 215 kDa na medida em que tem

uma necessidade de catiões bivalentes. Portanto, este receptor denomina-se dependente de catiões ($M-6-P^{DC}$) enquanto o de 215 kDa é denominado independente de catiões ($M-6-P^{IC}$). O receptor de $M-6-P^{DC}$ parece ser um oligómero com três subunidades com um peso molecular de subunidade de 46 kDa.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção envolve a produção de α -Gal A α -2,6-sialilada humana segregada contendo manose-6-fosfato por clonagem e expressão da sequência de codificação da α -Gal A num sistema de expressão em células hospedeiras de mamífero que expressa α 2,6-sialiltransferase. O sistema de expressão em células hospedeiras de mamífero aqui descrito proporciona as modificações simultâneas com a tradução e pós-tradução apropriadas, necessárias ao correcto processamento, e.g. glicosilação, sialilação, fosforilação, etc., e classificação do produto de expressão de modo a ser produzida uma enzima activa.

Embora Ioannou (Tese de Doutoramento, 1990) descreva estudos de sobre-expressão com α -Gal A, não foram divulgados nem sugeridos neste documento os métodos reivindicados para a produção de α -galactosidase A α -2,6-sialilada humana segregada. A presente invenção proporciona pela primeira vez alfa-galactosidase A α -2,6-sialilada humana segregada contendo manose-6-fosfato.

Utilizando os métodos aqui descritos, a α -Gal A α 2,6-sialilada contendo manose-6-fosfato recombinante é segregada pelas células hospedeiras de mamífero manipuladas que expressam α 2,6-sialiltransferase e α -Gal A de modo que é recuperada do meio de cultura com bom rendimento. A α -Gal A produzida de acordo com a invenção pode ser utilizada para uma variedade de finalidades, incluindo, mas não se lhes limitando, tratamento na Doença de Fabry, a conversão do tipo de sangue B em O, ou em qualquer processo comercial que envolva a hidrólise de resíduos α -D-galactosilo de glicoconjugados.

Adicionalmente, a presente invenção descreve um método em que α -Gal A α 2,6-sialilada humana contendo manose-6-fosfato,

que é normalmente direccionada intracelularmente é sobre-expressa e segregada selectivamente a partir de linhas de células de mamífero recombinantes para o meio de cultura das células de mamífero, a partir do qual é isolada a referida α -Gal.

A presente invenção proporciona um primeiro método, sendo o referido primeiro método para a produção de α -galactosidase A α 2,6-sialilada humana contendo manose-6-fosfato, segregada, compreendendo: (a) cultura de uma célula de mamífero transformada com um gene de β -galactósido- α 2,6-sialiltransferase que expressa β -galactósido- α 2,6-sialiltransferase de modo que a célula é capaz de sialilação de péptidos, adicionalmente contendo uma sequência nucleotídica heteróloga cromossomicamente integrada que codifica a α -galactosidase A humana operativamente associada com uma sequência nucleotídica que regula a expressão génica e um marcador seleccionável controlado pela mesma ou por uma diferente sequência reguladora, de modo que a sequência nucleotídica da α -galactosidase A é estavelmente sobre-expressa e uma glicoforma α 2,6-sialilada biologicamente activa da enzima α -galactosidase A contendo manose-6-fosfato é segregada pela célula de mamífero; e (b) isolamento enzimático da enzima α -galactosidase A activa a partir da cultura de células de mamífero. Numa concretização do primeiro método, a sequência nucleotídica que codifica a α -galactosidase A compreende a sequência representada na FIG. 1A-1C do nucleótido número 1 ao 1299. Noutra concretização do primeiro método, a sequência nucleotídica que codifica a α -galactosidase A compreende a sequência representada na FIG. 1A-1C do nucleótido número 91 ao 1299. Em ainda outras concretizações do primeiro método, a sequência nucleotídica que regula a expressão génica pode opcionalmente compreender um promotor viral ou um promotor indutível. Numa outra concretização do primeiro método, na presença de selecção, as sequências nucleotídicas cromossomicamente integradas são amplificadas. Em ainda uma outra concretização do primeiro método, o marcador seleccionável é di-hidrofolato-redutase (DHFR). Em ainda uma outra concretização do primeiro método, o marcador seleccionável é di-hidrofolato-redutase e a selecção é com metotrexato. Noutra concretização do primeiro método, a

célula de mamífero é uma linha de células de ovário de *hamster chinês* (CHO).

3.1. DEFINIÇÕES

Tal como aqui utilizados, os termos e abreviaturas seguintes terão o significado indicado:

α -Galactosidase A	α -Gal A
α -N-acetilGalactosaminidase	α -GalNAc
par(es) de bases	pb
ovário de <i>hamster chinês</i>	CHO
ADN complementar	ADNc
contagens por minuto	cpm
ácido desoxirribonucleico	ADN
Meio de Eagle Modificado por Dulbecco	DMEM
soro de vitelo fetal	FCS
quilo-pares de bases	kb
quilodalton	kDa
manose-6-fosfato	M-6-P
metotrexato	MTX
4-metilumbeliferil- α -D-galactósido	4-MU- α -Gal
4-metilumbeliferil- α -N-acetil-galactosaminida	4-MU- α -GalNAc
micrograma	μ g
micrómetro	μ m
nanograma	ng
nanómetro	nm
nucleótido	nt
p-nitrofenil- α -N-Acetilgalactosaminida	pNP- α -GalNAc
electroforese em gel de poliacrilamida	PAGE
reacção em cadeia pela polimerase	PCR
ácido ribonucleico	ARN
dodecilsulfato de sódio	SDS
unidades	U

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1A-1C. Sequência de ADNc de comprimento completo de α -Gal humana. As sequências de aminoácidos N-terminais, de brometo de cianogénio (CB) e do péptido tríptico (T), obtidas da micro-sequenciação peptídica, estão indicadas a sublinhado.

São mostradas as diferenças em relação à sequência prevista a partir do ADNc. Os quatro locais de N-glicosilação putativos estão assinalados e os sinais de terminação a 3' estão indicados com uma linha superior.

FIG. 1D-1F. Alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos ADNc de comprimento completo que codificam α -Gal-NAC humana (α -Gal B), α -Gal, Mel 1 de levedura e Mel A de *E. coli*. Dois pontos, resíduos idênticos; pontos individuais, aminoácidos isofuncionais; e caixas, resíduos idênticos em α -GalNAC, α -Gal, Mel 1 e/ou Mel A. Foram introduzidos hiatos para um alinhamento óptimo. As linhas verticais numeradas indicam fronteiras de exões para α -Gal (Bishop, et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3903-3907)

FIG. 1G. Construção do vector de expressão de α -Gal de mamífero p91-AGA. O ADNc de comprimento completo foi excisado a partir do plasmídeo pcDAG126, adaptado pela adição de ligantes Eco RI e subsequentemente clonado no local Eco RI do vector de expressão p91023(B).

FIG. 2A-2B. Expressão transiente de α -Gal humana em células COS-1. A actividade máxima (U/mg) foi atingida 72 horas após transfecção em células que receberam a construção p91-AGA. Não se observou aumento na actividade de α -Gal em células que não receberam o ADN plasmídico nem em células que receberam o vector p91 com o ADNc de α -Gal na orientação inversa.

FIG. 3A-3B. Efeito de soro sobre a secreção de α -Gal recombinante por CHO DG5.3. As células foram plaqueadas em DMEM suplementado com a concentração de soro apropriada (FIG. 3A). As células foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de FCS. Após a confluência (~4 dias), substituiu-se o meio por DMEM fresco suplementado com a concentração de soro apropriada (FIG. 3B).

FIG. 4. Produção de alto nível de α -Gal recombinante num biorreactor de fibras ocas. A quantidade de soro fetal bovino necessária para este sistema para um crescimento celular e

secreção de proteína óptimos pôde ser diminuída para cerca de 1%.

FIG. 5. SDS-PAGE de cada passo do esquema de purificação da α -Gal. Pistas 1, 6, marcadores de peso molecular; pista 2, meio bruto; pista 3, cromatografia de afinidade; pista 4, cromatografia em octil-Sepharose; pista 5, cromatografia em Superose 6.

FIG. 6. Células totais (pistas 1-4) e meios (pistas 5-8) de células de controlo DG44 (pistas 1,5), células DG5 (pistas 2, 6), células DG5.3 (pistas 3,7) e células DG11 (pistas 4,8), marcadas com [^{35} S]-metionina.

FIG. 7A-7C. Propriedades físico-cinéticas de α -Gal recombinante. Km no sentido do substrato artificial 4-MU- α -D-galactopiranosídeo (FIG. 7A). Ponto isoeléctrico da enzima recombinante e purificada de plasma humano (FIG. 7B). pH óptimo da enzima recombinante. (FIG. 7C).

FIG. 8A-8B. Degradação de P-C₁₂STH por células CHO DG5.3 que sobre-produzem α -Gal humana. Observa-se uma rápida degradação deste substrato pela acumulação de P-C₁₂SDH.

FIG. 9. Aquisição de pontes de dissulfureto por α -Gal recombinante. Marcaram-se células CHO DG5.3 com [^{35} S]-metionina e seguiram-se durante os tempos indicados. A SDS-PAGE na ausência de um agente redutor revela a formação de estruturas secundárias através da formação de ligações de dissulfureto.

FIG. 10. Chegada de α -Gal recentemente sintetizada à rede de Golgi detectada pela aquisição de oligossacáridos resistentes a Endo H.

FIG. 11. Taxa de secreção de α -Gal recombinante. As células CHO DG5.3 foram marcadas com [^{35} S]-metionina durante 5 min e seguidas com metionina fria. Removeram-se alíquotas de meio de cultura nos tempos indicados e imunoprecipitaram-se com anticorpos policlonais anti- α -Gal.

FIG. 12. SDS-PAGE de meios de cultura de células DG44 (pista 1; controlo), DG5 (pista 2) e DG5.3 (pistas 3,4) marcadas com [³⁵S]-metionina durante 1 hora (pistas 1-3) e 24 horas (pista 4).

FIG. 13. Análise das porções hidrato de carbono na α -Gal recombinante. As células CHO DG5.3 foram marcadas com [³⁵S]-metionina durante 24 horas, os meios de cultura foram recolhidos e a enzima recombinante foi imunoprecipitada. Digeriram-se alíquotas com endo D (pista 2), Endo H (pista 3), Endo F (pista 4), PNGase F (pista 5), Endo D e H (pista 6), Endo H e F (pista 7) e Endo H, F e PNGase F (pista 8). Amostras não tratadas (pistas 1, 9).

FIG. 14. Formas celular (pistas 1,3) e segregada (pistas 2,4) de α -Gal recombinante tratada com PNGase F (pistas 3,4). Controlos (pistas 1,2).

FIG. 15. Efeito de inibidores da glicosilação sobre a secreção de α -Gal recombinante.

FIG. 16. Marcação com ³²P de CHO DG44 (pistas 2, 3) e DG5.3 (pistas 1, 4). A α -Gal foi imunoprecipitada a partir das células (pistas 1, 2) e dos meios (pistas 2, 3).

FIG. 17A-17D. Cromatografia em QAE-Sephadex de oligossacáridos sensíveis a endo H de α -Gal recombinante. Oligossacáridos não tratados, tratados com HCl diluído, tratados com neuraminidase e tratados com fosfatase alcalina.

FIG. 18. Oligossacáridos sensíveis a Endo H de α -Gal recombinante cromatografados em receptor de M-6-P. Círculos a cheio, pico menos 4, círculos a branco, pico menos 2.

FIG. 19. Cromatografia de α -Gal recombinante em receptor de M-6-P. Células DG5.3 marcadas com [³⁵S]-metionina durante 24 horas e meios colhidos para cromatografia. Círculos a cheio, actividade de α -Gal; caixas a branco, radioactividade total.

FIG. 20A-20C. Cromatografia de afinidade de α -Gal recombinante e humana em receptor de M-6-P. As células foram

marcadas com [^{35}S]-metionina durante 24 horas na presença de NH_4Cl e colheram-se os meios de cultura. Secreções de DG5.3 (FIG. 20A), secreções de MS914 (FIG. 20B) e secreções de 293 (FIG. 20C). Círculos a cheio, actividade de α -Gal. Quadrados, radioactividade total. Círculos a branco, gradiente de M-6-P utilizado para eluição.

FIG. 21. Assimilação de α -Gal recombinante por fibroblastos de Fabry. As células foram incubadas para as quantidades indicadas de α -Gal durante 6 horas. Círculos a branco, assimilação de α -Gal, círculos a cheio, assimilação na presença de M-6-P 2mM.

FIG. 22. Esquema de construção da fusão de α -Gal proteína A. A fusão foi realizada em duas reacções PCR separadas como descrito na Secção 9.1.

FIG. 23. Sequência nucleotídica do domínio E de proteína A, sequência de clivagem por collagenase e sequência de 3' α -Gal (23A). Esquema da construção de fusão apresentando o consenso da collagenase em relação aos domínios de α -Gal e proteína A (23B).

FIG. 24A-24B. Depuração do plasma após administração intravenosa a ratinhos da α -galactosidase A humana recombinante segregada contendo resíduos de ácido siálico em $\alpha 2,6$ (Δ -- Δ) e a glicoforma não sialilada em $\alpha 2,6$ ($\bullet$ -- $\bullet$) no gráfico superior, em comparação com a depuração do plasma destas glicoformas após tratamento com fosfatase ácida. Cada ponto representa a média dos valores de duas injecções independentes. Os valores de $T_{1/2}$ foram estimados por extrapolação.

FIG. 25. Distribuição nos tecidos de diferentes formas de α -Gal A humana recombinante segregada após administração intravenosa a ratinhos. Cada ponto representa a média dos valores de duas injecções independentes.

FIG. 26. Células CHO DG5.3-1000Mx Contêm Estruturas Cristalinas de α -Gal A Humana Sobre-expressa. Micrografias electrónicas de células DG5.3-1000Mx que apresentam estruturas cristalinas em vacúolos limitados por membrana simples (26A) e

em vesículas, presumivelmente no *trans*-Golgi dilatado (26B; barra, 0,15 μm e 0,10 μm , respectivamente). 26C e D: Localização microscópica imunoelectrónica de α -Gal A humana com partículas de ouro coloidal de 10 nm (barra, 0,31 μm e 0,19 μm , respectivamente). 26E: Micrografia electrónica de células dfhr DG44 progenitoras (barra, 1,11 μm); inserto apresentando o complexo de Golgi (setas) em células dfhr DG44 (barra, 0,5 μm).

FIG. 27A-27C. A Agregação de α -Gal A Segregada Purificada é Dependente da Concentração de Enzima e do pH. 27A: Precipitação de α -Gal A (10 mg/ml) com pH decrescente. Note-se que cerca de 12% da enzima incubada foi precipitada a pH 6,0, o pH estimado da Rede *trans*-Golgi (TGN). 27B: Turbidez de concentrações crescentes de α -Gal A segregada a pH 5,0 (círculos a cheio) e pH 7,0 (triângulos a cheio) na ausência de Albumina Sérica Bovina (BSA). Como controlo para a precipitação não específica com concentração crescente de proteína, misturou-se a α -Gal A segregada (1 mg/ml) com concentrações crescentes de BSA (0,1 a 10 mg/ml) a pH 5,0 (quadrados a cheio). 27C: SDS-PAGE de fracções dos sobrenadante e de peletes de misturas de α -Gal A segregada purificada (10 mg/ml) e BSA (2 mg/ml) incubada a valores decrescentes de pH. Note-se que a α -Gal A foi precipitada com pH decrescente enquanto as concentrações de BSA solúvel e precipitada essencialmente não foram alteradas.

FIG. 28. Modelo de Agregação-Secreção para Secreção Selectiva de α -Gal A Humana Sobre-expressa em Células CHO. A sobre-expressão em nível elevado em células CHO de α -Gal A humana ou outras enzimas lisossómicas normalmente direccionadas para lisossomas resulta na sua secreção selectiva devido à sua agregação e à resultante inacessibilidade dos seus sinais M6PR. As enzimas sofrem processamento pós-tradução normal até à chegada à TGN, onde a enzima sobre-expressa sofre interacções proteína-proteína e forma agregados particulados maiores e solúveis menores, devido ao menor pH da TGN. A TGN fica dilatada com a enzima sobre-expressa. Alguns agregados e enzima solúvel com sinais M6P expostos são transitados para lisossomas, enquanto a maioria dos agregados cujos M6P não estão acessíveis são exocitados por defeito através da via secretória constitutiva.

Também pode ocorrer sulfatação diminuída pois as tirosinas em agregados de enzima destinados a secreção estão indisponíveis à sulfotransferase. O modelo pode explicar a secreção selectiva de outras proteínas sobre-expressas que normalmente são direccionadas para organelos específicos.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método para produção de uma α -galactosidase A α 2,6-sialilada humana segregada, em que a referida α -galactosidase A contém manose-6-fosfato, compreendendo a cultura de uma célula de mamífero manipulada que expressa α 2,6-sialiltransferase e α -galactosidase A sob condições em que a α -galactosidase A é sobre-expressa e selectivamente segregada para o meio de cultura das células de mamífero; e o isolamento da referida α -galactosidase A a partir do meio de cultura celular. Numa concretização específica, a célula de mamífero manipulada expressa di-hidrofolato-redutase (DHFR). Noutra concretização específica, a referida α -galactosidase A no meio de cultura celular é obténível por amplificação de uma sequência nucleotídica de α -galactosidase A com metotrexato 1000 μ M. A presente invenção refere-se ainda a uma α -galactosidase A α 2,6-sialilada humana segregada contendo manose-6-fosfato. Numa concretização específica a referida α -galactosidase A é obténível pelo método descrito acima.

A expressão e produção bem sucedidas desta enzima biologicamente activa, purificada, tal como aqui descrito e exemplificado, são particularmente significativas por várias razões. Por exemplo, esforços anteriores para expressar o ADNc de comprimento completo que codifica a α -Gal A humana utilizando vários vectores de expressão procariotas resultaram em expressão da enzima, como evidenciado por ensaios à enzima de células hospedeiras microbianas intactas e crescimento em melibiose como fonte de carbono; contudo, a enzima humana foi expressa em baixos níveis e não podia ser purificada das bactérias. Estes resultados indicam que a enzima recombinante expressa em sistemas microbianos era instável devido à falta de glicosilação normal e/ou à presença de proteases citoplasmáticas ou periplasmáticas endógenas.

Os esforços para expressar esta enzima em sistemas de expressão eucariotas foram igualmente difíceis por diferentes razões. A α -Gal A é uma enzima lisossómica codificada por um gene "governante" ("*housekeeping*"). O produto de tradução primário é altamente modificado e processado, requerendo uma série complexa de eventos que envolvem a clivagem de uma sequência de sinal, glicosilação, fosforilação e sialilação, que apenas podem ser correctamente efectuados pelas células hospedeiras apropriadas. Além disso, uma vez que o produto de expressão se destina ao lisossoma, que permanece no espaço intracelular, é bastante surpreendente que os métodos aqui descritos permitam a secreção de uma molécula correctamente processada, biologicamente activa.

A α -Gal A α 2,6-sialilada humana contendo manose-6-fosfato biologicamente activa produzida de acordo com a invenção tem uma variedade de utilizações, sendo provavelmente a mais significativa a sua utilização em terapia de substituição enzimática para a desordem de armazenamento lisossómico, a doença de Fabry. Por exemplo, o defeito metabólico em fibroblastos de cultura provenientes da doença de Fabry pode ser corrigido *in vitro* através da adição de α -Gal A exógena ao meio de cultura. Em adição, ensaios humanos limitados demonstraram a eficácia bioquímica da substituição enzimática na depleção do substrato em circulação antes da deposição vascular. Contudo, antes da presente invenção, não podiam ser produzidas grandes quantidades de α -Gal A humana purificada, biologicamente activa, para utilização em terapias de substituição. A α -Gal A produzida de acordo com a invenção tem também várias utilizações industriais, e.g., em qualquer processo que envolva a hidrólise de glicoconjugados de α -D-galatosilo, a conversão do grupo sanguíneo B no grupo O, etc., como aqui descrito.

A invenção divide-se nas seguintes secções, somente para fins de descrição: (a) a sequência de codificação para α -Gal A; (b) a construção de um vector de expressão que dirigirá a expressão da sequência de codificação da enzima; (c) a transfecção de células hospedeiras apropriadas que são capazes de replicação, tradução e processamento correcto dos transcritos primários de modo a expressar um produto génico

biologicamente activo; e (d) a identificação e/ou purificação da enzima assim produzida. Uma vez identificado um transformante que expresse níveis elevados de enzima biologicamente activa, a prática da invenção envolve a expansão e utilização desse clone na produção e purificação de α -Gal A α 2,6-sialilada humana contendo manose-6-fosfato biologicamente activa.

A invenção é aqui demonstrada por meio de exemplos nos quais ADNc de α -Gal A foram clonados e expressos num sistema de expressão em mamífero que expressa α 2,6-sialiltransferase. São também descritas modificações às sequências de codificação de ADNc que melhoram o rendimento, e simplificam a purificação sem prejuízo da actividade biológica. Adicionalmente, descrevem-se modificações às células hospedeiras que permitem a expressão da glicoforma α 2,6-sialilada da enzima, a qual pode ser facilmente purificada. Embora a invenção seja descrita para α -Gal A, os métodos e modificações explicados podem ser analogamente aplicados à expressão de outras proteínas segregadas, e em particular, outras enzimas lisossômicas incluindo, mas não se lhes limitando, α -N-acetilgalactosaminidase e esfingomielinase ácida.

Descrevem-se vários aspectos da invenção com maior detalhe nas subsecções adiante e nos exemplos que se seguem.

5.1. A SEQUÊNCIA DE CODIFICAÇÃO DE α -GAL A

A sequência nucleotídica de codificação e a sequência de aminoácidos deduzida para a α -Gal A estão representadas na FIG. 1A-1C. Esta sequência nucleotídica, ou seus fragmentos ou equivalentes funcionais, podem ser utilizados para gerar moléculas de ADN recombinante que dirigem a expressão do produto enzimático, ou péptidos funcionalmente activos ou seus equivalentes funcionais, em células hospedeiras apropriadas.

Devido à degenerescência da sequência nucleotídica de codificação, outras sequências de ADN que codificam substancialmente as mesmas sequências de aminoácidos, como representadas na FIG. 1A-1C, podem ser utilizadas na prática da invenção para a clonagem e expressão de α -Gal A. Estas alterações incluem deleções, adições ou substituições de

diferentes resíduos nucleotídicos que resultam numa sequência que codifica o mesmo produto génico ou um funcionalmente equivalente. O produto génico pode conter deleções, adições ou substituições de resíduos de aminoácido no interior da sequência, que resultam numa alteração silenciosa, produzindo assim um produto bioactivo. Estas substituições de aminoácidos podem ser realizadas com base em semelhança de polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliicidade, a natureza anfipática dos resíduos envolvidos e/ou com base em dados cristalográficos. Por exemplo, aminoácidos negativamente carregados incluem ácido aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos positivamente carregados incluem lisina e arginina; aminoácidos com grupos de cabeça polares não carregados possuindo valores de hidrofiliicidade semelhantes incluem os seguintes: leucina, isoleucina, valina; glicina, alanina; asparagina, glutamina; serina, treonina; fenilalanina, tirosina.

As sequências de codificação para α -Gal A podem ser convenientemente obtidas de linhas celulares ou microorganismos geneticamente manipulados contendo as sequências de codificação da enzima, tais como as concretizações depositadas aqui descritas. Alternativamente, sequências genómicas ou sequências de codificação de ADN para estas enzimas podem ser obtidos de bibliotecas de ADNc ou genómicas humanas. As bibliotecas, quer de ADNc quer genómicas, podem ser preparadas a partir de fragmentos de ADN gerados a partir de fontes de células humanas. Os fragmentos que codificam α -Gal A podem ser identificados por rastreio destas bibliotecas com uma sonda nucleotídica que seja substancialmente complementar com qualquer porção da sequência representada na FIG. 1A-1C. De facto, as sequências geradas por reacção em cadeia pela polimerase podem ser ligadas para formar a sequência de comprimento completo. Apesar de se poderem utilizar porções das sequências de codificação, os clones de comprimento completo, *i.e.*, os que contêm toda a região de codificação para a α -Gal A, podem ser preferíveis para a expressão. Alternativamente, as sequências de codificação representadas na FIG. 1A-1C podem ser alteradas através da adição de sequências que podem ser utilizadas para aumentar os níveis de expressão e/ou para facilitar a purificação. Por exemplo, como demonstrado nos exemplos

comparativos aqui descritos, a sequência de codificação de α -Gal A foi modificada pela adição da sequência nucleotídica que codifica o local de clivagem para colagenase seguida pela Proteína A de estafilococos. A expressão desta construção génica quimérica resultou numa proteína de fusão consistindo em α -Gal A - o substrato da colagenase -- Proteína A. Esta proteína de fusão foi prontamente purificada utilizando uma coluna de IgG que se liga à porção Proteína A. A α -Gal A não fundida foi libertada da coluna por tratamento com colagenase que clivou a α -Gal A da porção Proteína A ligada à coluna. Outros substratos de clivagem pela enzima e proteínas de ligação, podem ser manipulados em construções semelhantes para a produção de α -Gal A que pode ser prontamente purificada e libertada na sua forma biologicamente activa.

Podem-se utilizar técnicas bem conhecidas dos peritos na especialidade para o isolamento de ADN, produção dos fragmentos de restrição apropriados, construção de clones e bibliotecas, e rastreio de recombinantes. Para uma revisão destas técnicas veja-se, por exemplo, Sambrook, *et al.*, 1989, "Molecular Cloning A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Press, N.Y., Capítulos 1-18.

A sequência de codificação da FIG. 1A-1C pode alternativamente ser sintetizada, no todo ou em parte, utilizando métodos químicos bem conhecidos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Caruthers, *et al.*, 1980, *Nuc. Acids Res. Symp. Ser.* 7: 215-233; Crea & Horn, 1980, *Nuc. Acids Res.* 9(10): 2331; Matteucchi & Carruthers, 1980, *Tetrahedron Letters* 21: 719; e Chow e Kempe, 1981, *Nuc. Acids Res.* 9(12): 2807-2817.

Alternativamente, a própria proteína pode ser produzida utilizando métodos químicos para sintetizar a sequência de aminoácidos representada na FIG. 1A-1C no todo ou em parte. Por exemplo, péptidos podem ser sintetizados por técnicas em fase sólida, clivados da resina e purificados por cromatografia líquida de alta resolução preparativa. (*E.g.*, veja-se, Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y. pp. 50-60). A composição dos péptidos sintéticos pode ser confirmada por análise ou sequenciação dos aminoácidos (*e.g.*, o procedimento de

degradação de Edman; veja-se Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N.Y., pp. 34-49).

A α -Gal A humana é uma glicoproteína homodimérica. O ADNc da α -Gal A de comprimento completo prevê uma subunidade madura de 398 aminoácidos. A sequência de aminoácidos possui uma homologia global de cerca de 50% com a α -N-acetilgalactosaminidase (α -Gal B) humana. Pesquisas de homologia com bases de dados computadorizadas revelaram pequenas regiões de homologia da α -Gal A com as sequências de aminoácidos da Mel 1 de levedura e da Mel A de *E. coli* (veja-se a FIG. 1D-1F). É provável que estas regiões conservadas sejam importantes para a conformação, estabilidade, associação de subunidades e/ou catálise da enzima. Assim, prefere-se não alterar estas regiões conservadas. Contudo, certas modificações na sequência de codificação podem ser vantajosas. Por exemplo, as quatro sequências de consenso de glicosilação ligada a N podem ser selectivamente obliteradas, alterando assim a glicosilação da enzima e afectando a fosforilação, a sialilação, a sulfatação, etc. Estas enzimas modificadas podem ter alteradas as propriedades de depuração e direccionamento quando injectadas em pacientes de Fabry.

Modificações de oligossacáridos podem ser úteis no direccionamento de α -Gal A para terapia enzimática eficaz. Alguns exemplos destas modificações estão descritos com maior detalhe *infra*. Estudos prévios demonstraram que a glicoforma plasmática da α -Gal A, que é mais altamente sialilada do que a glicoforma esplénica, foi mais eficaz na depleção do substrato tóxico acumulado em circulação de pacientes de Fabry (Desnick *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5326-5330). Estudos de caracterização das glicoformas esplénicas e plasmáticas purificadas da enzima revelaram diferenças apenas nas suas porções de oligossacárido (Desnick *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5326-5330). Assim, esforços para direccionar a enzima recombinante para o tratamento eficaz da doença de Fabry podem ser melhorados através da modificação dos locais de N-glicosilação.

Também, as regiões de codificação e não traduzida a 5' da sequência nucleotídica podem ser alteradas para melhorar a eficiência de tradução do ARNm de α -Gal A. Por exemplo, a substituição por uma citosina, da guanosina na posição +4 do ADNc de α -Gal A, pode melhorar a eficiência de tradução do ARNm da α -Gal A de 5 a 10 vezes (Kozak, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 947-950).

Em adição, com base em dados de cristalografia de raios-x, podem ser realizadas alterações de sequência para melhorar a estabilidade da proteína, e.g., introduzindo pontes de dissulfureto nas posições apropriadas e/ou procedendo à deleção ou substituição de aminoácidos que se prevê virem a causar instabilidade na proteína. Estes são apenas exemplos de modificações que podem ser manipuladas na enzima α -Gal A para produzir uma proteína mais activa ou estável, mais proteína enzima, ou mesmo alterar a especificidade catalítica da enzima.

5.2. PRODUÇÃO DE α -GAL A RECOMBINANTE

De modo a expressar uma α -Gal A biologicamente activa, a sequência de codificação para a enzima, um equivalente funcional ou uma sequência modificada, como descrito na Secção 5.1, *supra*, é inserida num vector de expressão eucariota apropriado, i.e., um vector que contém os elementos necessários para a transcrição e a tradução da sequência de codificação inserida em células hospedeiras de mamífero apropriadas que possuem a maquinaria celular e os elementos para o processamento correcto, i.e., clivagem de sinal, glicosilação, fosforilação, sialilação e classificação proteica. Os sistemas de expressão em células hospedeiras de mamífero são preferidos para a expressão de enzimas biologicamente activas que são correctamente dobradas e processadas; quando administrados a seres humanos, estes produtos de expressão deverão exhibir um direccionamento correcto aos tecidos e não exhibir reacção imunológica adversa.

5.2.1. CONSTRUÇÃO DE VECTORES DE EXPRESSÃO E PREPARAÇÃO DE TRANSFECTANTES

Podem utilizar-se métodos que são bem conhecidos dos peritos na especialidade para construir vectores de expressão contendo a sequência de codificação de α -Gal A e sinais de controlo de transcrição/tradução apropriados. Estes métodos incluem recombinação *in vitro*/recombinação genética. Vejam-se, por exemplo, as técnicas descritas em Maniatis *et al.*, 1982, "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., Capítulo 12.

Podem ser utilizados uma variedade de sistemas de expressão em hospedeiros mamíferos para expressar a sequência de codificação de α -Gal A. Apesar de sistemas procariotas oferecerem a vantagem distinta de facilidade de manipulação e baixo custo de aumento de escala, a sua principal desvantagem na expressão de α -Gal A é a sua falta de correctas modificações pós-tradução nas proteínas de mamífero expressas. Preferivelmente os sistemas de expressão em mamífero permitem que ocorra a correcta modificação. As células de mamífero que possuem a maquinaria celular para os correctos processamento do transcrito primário, glicosilação, fosforilação e, vantajosamente, secreção do produto génico, deverão ser utilizadas como células hospedeiras para a expressão de α -Gal A. As linhas celulares de mamífero são preferidas. Estas linhas celulares hospedeiras podem incluir, mas não se lhes limitam, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, -293, WI38, etc. As células hospedeiras de mamífero que possuem alguma, mas não toda a maquinaria celular necessária para o processamento opcional do transcrito primário, e/ou processamento pós-tradução e/ou secreção do produto génico, podem ser modificadas para melhorar as capacidades de processamento da célula hospedeira. Por exemplo, uma sequência nucleotídica recombinante que codifica um produto peptídico que desempenha uma função de processamento que a célula hospedeira não era antes capaz de desempenhar, tal como a α 2,6-sialiltransferase, pode ser manipulada na linha celular hospedeira. Uma tal sequência pode ser co-transfectada para a célula hospedeira juntamente com o gene de interesse ou pode ser incluída na construção recombinante que codifica o gene de interesse. Alternativamente, podem ser produzidas linhas celulares

contendo esta sequência que são então transfectadas com o gene de interesse.

Os vectores de expressão eucarióticos apropriados devem ser utilizados para dirigir a expressão de α -Gal A na célula hospedeira escolhida. Podem ser seguidas, por exemplo, pelo menos duas abordagens básicas, para a concepção de vectores sobre SV40. A primeira consiste em substituir a região precoce de SV40 por um gene de interesse, enquanto a segunda consiste em substituir a região tardia (Hammarskjold, *et al.*, 1986, *Gene* 43: 41). Os vectores de substituição da região precoce e tardia podem também ser complementados *in vitro* pelo mutante de SV40 apropriado sem a região tardia ou precoce. Esta complementação produzirá recombinantes que são empacotados em cápsides infecciosas e que contêm o gene de α -Gal A. Uma linha celular permissiva pode então ser infectada para produzir a proteína recombinante. Os vectores baseados em SV40 podem também ser utilizados em estudos de expressão transiente, onde os melhores resultados são obtidos quando estes são introduzidos em células COS (CV-1, origem de SV40), um derivado de CV-1 (células de rim de macaco verde) que contém uma única cópia de um genoma de SV40 defectivo na origem, integrada no cromossoma. Estas células sintetizam activamente o antigénio T grande (SV40), iniciando assim a replicação a partir de qualquer plasmídeo contendo uma origem de replicação de SV40.

Em adição ao SV40, podem ser utilizados praticamente todos os vírus ou retrovírus molecularmente clonados como veículo de expressão ou clonagem. Podem ser utilizados para expressão vectores virais baseados em vários retrovírus (avícolas e murídeos), adenovírus, vírus *vaccinia* (Cochran, *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 19) e poliomavírus. Outros vírus clonados, tais como JC (Howley, *et al.*, 1980, *J. Virol* 36: 878), BK e os vírus de papiloma humanos (Heilman, *et al.*, 1980, *J. Virol* 36: 395), oferecem o potencial de serem utilizados como vectores de expressão eucariotas. Por exemplo, quando se utilizam vectores de expressão em adenovírus, a sequência de codificação de α -Gal A pode ser ligada a um complexo de controlo de transcrição/tradução de adenovírus, *e.g.*, o promotor tardio e a sequência de comando tripartida. Este gene quimérico pode então ser inserido no genoma do

adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (e.g., região E1 ou E3) resultará num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a enzima humana em hospedeiros infectados (e.g., veja-se Logan & Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 3655-3659). Alternativamente, pode ser utilizado o promotor de 7,5K do vírus *vaccinia*. (e.g., veja-se Mackett *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 7415-7419; Mackett *et al.*, 1984, *J. Virol.* 49: 857-864; Panicali *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4927-4931). Têm interesse particular os vectores baseados no vírus de papiloma bovino (Sarver, *et al.*, 1981, *Mol. Cell. Biol.* 1: 486). Estes vectores possuem a capacidade de replicar como elementos extracromossómicos. Pouco depois da entrada deste ADN nas células de ratinho, o plasmídeo replica até cerca de 100 a 200 cópias por célula. A transcrição do ADNc inserido não necessita de integração do plasmídeo no cromossoma do hospedeiro, produzindo assim um elevado nível de expressão. Estes vectores podem ser utilizados para expressão estável incluindo um marcador seleccionável no plasmídeo, tal como o gene *neo*. Pode também ser conseguido um elevado nível de expressão utilizando promotores indutíveis tais como o promotor de metalotionina IIA, promotores de choque térmico, etc.

Para produção de alto rendimento e a longo prazo de proteínas recombinantes prefere-se a expressão estável. Por exemplo, após a introdução de ADN estranho, as células manipuladas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias em meios enriquecidos, e depois são mudadas para meios selectivos. Em vez de utilizar vectores de expressão que contêm origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com a α -Gal A ou o ADN controlados por elementos de controlo da expressão apropriados (e.g., promotor, potenciador ("*enhancer*"), sequências, terminadores de transcrição, locais de poliadenilação, etc.) e um marcador seleccionável. O marcador seleccionável no plasmídeo recombinante confere resistência para a selecção e permite às células integrarem estávelmente o plasmídeo nos seus cromossomas e crescer para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhas celulares. Podem ser utilizados vários sistemas de selecção, incluindo, mas não se lhes limitando, os genes do vírus do herpes simples da

timidina-quinase (Wigler, et al, 1977, *Cell* 11: 223), da hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026), e da adenina-fosforribosiltransferase (Lowry, et al, 1980, *Cell* 22: 817), que podem ser empregues, respectivamente em células tk, hgprt ou aprt. Também a resistência anti-metabolito pode ser utilizada como base de selecção para os genes dhfr, que confere resistência a metotrexato (Wigler, et al, 1980, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3567; O'Hare, et al, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527); gpt, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072; neo, que confere resistência ao aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, et al, 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1); e hygro, que confere resistência a higromicina (Santerre, et al, 1984, *Gene* 30: 147). Recentemente, foram descritos genes seleccionáveis adicionais, nomeadamente o trpB que permite às células utilizar indole em vez de triptofano; o hisD, que permite às células utilizar histinol em vez de histidina (Hartman & Mulligan, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8047); e ODC (ornitina-descarboxilase) que confere resistência ao inibidor de ornitina-descarboxilase, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue L., 1987, Em: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

Os sistemas de expressão eucariotas alternativos que podem ser utilizados para expressar as enzimas α -Gal A são levedura transformada com vectores de expressão em levedura recombinantes contendo a sequência de codificação de α -Gal A; sistemas de células de insecto infectadas com vectores de expressão de vírus recombinantes (e.g., baculovírus) contendo a sequência de codificação de α -Gal A; ou sistemas de células vegetais infectadas com vectores de expressão de vírus recombinantes (e.g., vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vectores de expressão de plasmídeos recombinantes (e.g., plasmídeo Ti) contendo a sequência de codificação de α -Gal A.

Na levedura, podem ser utilizados vários vectores contendo promotores constitutivos ou indutíveis. Para uma revisão veja-se, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley

Interscience, Ch. 13; Grant et al., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, em Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp.516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; e Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684; e The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, 1982, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I e II. Para ensaios de complementação em levedura, os ADNc para α -Gal A podem ser clonados em plasmídeos epissómicos de levedura (YEp) que replicam autonomamente em levedura devido à presença do círculo de 2 μ de levedura. O ADNc pode ser clonado por trás de um promotor constitutivo de levedura tal como ADH ou LEU2 ou um promotor indutível tal como GAL (Cloning in Yeast, Chpt. 3, R. Rothstein Em: DNA Cloning Vol.11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.). As construções podem conter as regiões não traduzidas a 5' e 3' do ARNm de α -Gal A cognato ou as correspondentes a um gene de levedura. Os plasmídeos YEp transformam com elevada eficiência e os plasmídeos são extremamente estáveis. Alternativamente, podem ser utilizados vectores que promovem a integração de sequência de ADN estranho no cromossoma de levedura.

Em casos onde são utilizados vectores de expressão em plantas, a expressão da sequência de codificação de α -Gal A pode ser conduzida por qualquer de vários promotores. Por exemplo, podem ser utilizados promotores virais tais como os promotores 35S RNA e 19S RNA de CaMV (Brisson et al., 1984, *Nature* 310:511-514), ou o promotor da proteína do revestimento de TMV (Takamatsu et al., 1987, *EMBO J.* 6:307-311); alternativamente, podem ser utilizados promotores de plantas tais como a subunidade pequena de RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie et al., 1984, *Science* 224:838-843); ou podem ser utilizados promotores de choque térmico, e.g., hsp17.5-E ou hsp17.3-B de levedura (Gurley et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565). Estas construções podem ser introduzidas em células vegetais utilizando plasmídeos Ti, plasmídeos Ri, vectores de vírus de plantas; transformação directa de ADN; micro-injecção, electroporação, etc. Para revisões destas técnicas veja-se, por exemplo, Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular*

Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; e Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

Um sistema de expressão alternativo que pode ser utilizado para expressar α -Gal A é um sistema de insecto. Num destes sistemas, utiliza-se o vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência de α -Gal A pode ser clonada em regiões não essenciais (por exemplo o gene da poliedrina) do vírus e colocado sob o controlo de um promotor de AcNPV (por exemplo o promotor da poliedrina). A inserção bem sucedida da sequência de codificação resultará na inactivação do gene da poliedrina e na produção de vírus recombinantes não ocluídos (*i.e.*, vírus sem o revestimento proteínáceo codificado pelo gene da poliedrina). Estes vírus recombinantes são então utilizados para infectar células de *Spodoptera frugiperda* em que o gene inserido é expresso. (*e.g.*, veja-se Smith *et al.*, 1983, J. Virol. 46:584; Smith, Patente U.S. 4,215,051).

5.2.2. IDENTIFICAÇÃO DE TRANSFECTANTES OU TRANSFORMANTES QUE EXPRESSAM O PRODUTO α -GAL A

As células hospedeiras que contêm a sequência de codificação de α -Gal A e que expressam o produto génico biologicamente activo podem ser identificadas através de pelo menos quatro abordagens genéricas: (a) hibridação ADN-ADN ou ADN-ARN; (b) a presença ou ausência de funções de genes "marcadores"; (c) avaliação do nível de transcrição como medido pela expressão de transcritos de ARNm de α -Gal A na célula hospedeira; e (d) detecção do produto génico tal como medido por imunoensaio ou através da sua actividade biológica.

Na primeira abordagem, a presença da sequência de codificação de α -Gal A inserida no vector de expressão pode ser detectada por hibridação ADN-ADN ou ADN-ARN utilizando sondas compreendendo sequências nucleotídicas que são homólogas à sequência de codificação de α -Gal A substancialmente como mostrada na FIG. 1A-1C, ou suas porções ou derivados.

Na segunda abordagem, o sistema recombinante vector de expressão/hospedeiro pode ser identificado e seleccionado com base na presença ou ausência de certas funções de genes "marcadores" (e.g., actividade de timidina-quinase, resistência a antibióticos, resistência a metotrexato, fenótipo de transformação, formação de corpos de oclusão em baculovírus, etc.). Por exemplo, se a sequência de codificação de α -Gal A é inserida no interior de uma sequência de um gene marcador do vector, os recombinantes contendo a sequência de codificação de α -Gal A podem ser identificados pela ausência da função do gene marcador. Alternativamente, um gene marcador pode ser colocado em série com a sequência de α -Gal A sob o controlo do mesmo promotor ou de um promotor diferente do utilizado para o controlo da expressão da sequência de codificação da α -Gal A. A expressão do marcador em resposta à indução ou selecção indica expressão da sequência de codificação da α -Gal A.

Na terceira abordagem, a actividade de transcrição para a região de codificação da α -Gal A pode ser avaliada através de ensaios de hibridação. Por exemplo, pode ser isolado e analisado ARN por *Northern blot* utilizando uma sonda homóloga à sequência de codificação da α -Gal A ou a suas porções particulares, substancialmente como apresentado na FIG. 1A-1C. Alternativamente, podem-se extrair e ensaiar ácidos nucleicos totais da célula hospedeira para hibridação com essas sondas.

Na quarta abordagem, a expressão do produto proteínico α -Gal A pode ser avaliada imunologicamente, por exemplo por *Western blot*, imunoensaios tais como radioimunoprecipitação, imunoensaios com enzimas ligadas e semelhantes. O teste final ao sucesso do sistema de expressão, contudo, envolve a detecção do produto génico α -Gal A biologicamente activo. Quando a célula hospedeira segrega o produto génico, o meio isento de células obtido da célula hospedeira transfectante cultivada pode ser ensaiado quanto a actividade de α -Gal A. Quando o produto génico não é segregado, podem ser ensaiados lisados celulares quanto a esta actividade. Em qualquer caso, podem-se utilizar vários ensaios para detectar a actividade de α -Gal A, incluindo, mas não se lhes limitando: (a) ensaios que empregam os α -D-galactósidos sintéticos fluorogénicos ou

cromogénicos tais como 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosídeo (Desnick *et al*, 1973, *J. Lab. Clin. Invest.* 81: 157); (b) ensaios que empregam os substratos naturais marcado com fluorescência ou radioactivamente marcados tais como globotriaosil-ceramida tritiada ou pireno-dodecanoílesfingosina-tri-hexósido (Bishop e Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307); e (c) ensaios que empregam X- α -gal.

5.2.3. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO GÉNICO α -GAL

Uma vez identificado um clone que produz elevados níveis de α -Gal A biologicamente activa, o clone pode ser expandido e utilizado para produzir grandes quantidades da enzima que pode ser purificada utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade incluindo, mas não se lhes limitando, purificação por imunoafinidade, métodos cromatográficos incluindo cromatografia líquida de alta resolução e semelhantes. Quando a enzima é segregada pelas células cultivadas, a α -Gal A pode ser prontamente recuperada do meio de cultura.

Tal como demonstrado nos exemplos comparativos descritos *infra*, purificou-se α -Gal A recombinante a partir dos meios em bruto por cromatografia de afinidade em α -GalNH₂-C₁₂-Sepharose, seguida por cromatografia hidrófoba em Octil-Sepharose e filtração em gel numa coluna de 100 cm de Superose 6. A enzima recombinante era essencialmente homogénea após o passo de filtração em gel e era >98% pura, tal como avaliado por SDS-PAGE.

Purificou-se α -Gal A humana recombinante até à homogeneidade a partir do meio da linha celular CHO, DG5.3, que se demonstrou segregar a maior parte da enzima recombinante. O meio de cultura deste clone estava altamente enriquecido com α -Gal A quando se utilizou meio isento de soro, constituindo mais de 95% do total da proteína extracelular. Assim, a purificação até à homogeneidade pode ser conseguida com apenas três passos cromatográficos. Mais de meia grama de enzima foi produzida em três meses e a partir de uma sua porção purificaram-se 280 mg com um rendimento de 80% utilizando apenas equipamento à escala laboratorial. Foi

notável o facto de a enzima recombinante possuir a actividade enzimática completa com uma actividade específica igual à da enzima humana previamente purificada (Bishop, *et al*, 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 525: 399; Bishop e Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307). A enzima recombinante foi capaz de reconhecer e eficazmente clivar um análogo do substrato natural, globotriaosilceramida.

Quando a sequência de codificação da α -Gal A é manipulada para codificar uma proteína de fusão clivável, a purificação da α -Gal A pode ser prontamente realizada utilizando técnicas de purificação por afinidade. Nos exemplos de trabalho descritos *infra*, foi manipulada uma sequência de consenso de reconhecimento de clivagem por collagenase entre o terminal carboxi da α -Gal A e a proteína A. A proteína de fusão resultante foi prontamente purificada utilizando uma coluna de IgG que ligou a porção proteína A. A α -Gal A não fundida foi prontamente libertada da coluna por tratamento com collagenase.

Em particular, o método de extensão por sobreposição (Ho, *et al*, 1989, *Gene* 77: 51; Kadowaki, *et al*, 1989, *Gene* 76: 161) foi utilizado para fundir o ADNc da α -Gal A de comprimento completo ao domínio E da proteína A de *Staphylococcus aureus*. Após transfecção por electroporação, a actividade de α -Gal A em extractos de células COS-1 foi aumentada 6 a 7 vezes. Em adição, as células transfectadas segregaram quantidades significativas da proteína de fusão para os meios de cultura (400 U/ml). A proteína de fusão segregada foi rapidamente purificada através de um único passo de purificação por afinidade com IgG. A manipulação de uma sequência de consenso de reconhecimento de clivagem por collagenase entre estes dois polipéptidos facilitou a clivagem da proteína de fusão de modo a que o polipéptido de α -Gal A humana purificado pudesse ser prontamente separado do domínio da proteína A através de um segundo passo de purificação com IgG. Foi interessante o facto de que a construção de fusão reteve a actividade de α -Gal, indicando presumivelmente que o polipéptido da enzima formou a configuração homodimérica activa mesmo estando o terminal carboxi unido a 56 resíduos adicionais do domínio da proteína A. Uma vez que células COS-1 transfectadas com uma construção de α -Gal A exibem níveis semelhantes de expressão e

distribuição entre células e meios, parece que o domínio da proteína A não interfere nem com a dobragem nem com o processamento correcto desta enzima lisossómica. Adicionalmente, a presença do polipéptido de α -Gal A dimerizado não inibiu a ligação do domínio da proteína A à coluna de afinidade de IgG. A inserção da sequência de reconhecimento de clivagem por collagenase, de quatro resíduos, entre os polipéptidos de α -Gal A e proteína A permitiu a clivagem da proteína de fusão deixando apenas dois dos resíduos de colagénio em cada um dos péptidos.

A facilidade da construção de ADNc utilizando a reacção em cadeia pela polimerase, a transfecção e a purificação da proteína expressa permite o isolamento de uma quantidade pequena, mas suficiente, de α -Gal A para a caracterização das propriedades físicas e cinéticas da enzima. Utilizando mutagénese dirigida ao local ou sequências mutantes de ocorrência natural, este sistema proporciona uma abordagem razoável para a determinação dos efeitos da estrutura primária alterada sobre a função da proteína. As construções de fusão com o domínio E da proteína A antes do terminal amino e após o terminal carboxi podem também ser manipuladas para avaliar que construção de fusão irá interferir menos, se interferir, com a função biológica da proteína e a capacidade para ligar IgG.

Qualquer local de clivagem ou substrato de clivagem da enzima, pode ser manipulado entre a sequência da α -Gal A e um segundo péptido ou proteína que tenha um parceiro de ligação que possa ser utilizado para a purificação, e.g., qualquer antígeno para o qual possa ser preparada uma coluna de imunoafinidade.

5.2.4. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE

A enzima recombinante purificada produzida nos sistemas de expressão em mamífero aqui descritos (e.g., o sistema de expressão CHO), tinha um peso molecular, um óptimo de pH, valores de km e ponto isoeléctrico, que eram essencialmente idênticos aos da enzima purificada do plasma humano (Bishop, et al, 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 525: 399; Bishop e Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307). A análise das porções hidrato de carbono desta enzima revelou a presença de

três cadeias oligossacarídicas no polipéptido de α -Gal A. Estas cadeias eram uma mistura de tipos complexos, híbridos e de elevado teor de manose como evidenciado por estudos com endoglicosidase e em QAE Sephadex. De modo mais importante, a enzima recombinante era também semelhante à forma plasmática nativa da α -Gal A na medida em que possuía porções ácido siálico terminais (Bishop & Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307). No ensaio clínico limitado descrito *supra*, mostrou-se que a forma plasmática da enzima era mais eficaz na degradação de GbOse₃Cer em circulação do que a forma esplénica. Portanto, a enzima recombinante ou uma enzima recombinante modificada, incluindo, mas não se lhes limitando, modificações das suas cadeias hidrato de carbono ou sequência de aminoácidos, podem ser a forma mais apropriada para terapia de substituição enzimática na doença de Fabry. De facto, a captação saturável de α -Gal A recombinante por fibroblastos normais e de Fabry é demonstrada nos exemplos, e mostrou-se ser especificamente inibida por manose-6-fosfato 2 mM.

Em adição, o sistema de expressão CHO aqui descrito é muito promissor para estudos da biologia celular de biogénese de lisossomas e processamento de glico-hidrolase. A microscopia óptica revelou citoplasma altamente vacuolado nas células CHO DG5.3, sugerindo uma proliferação de membranas lisossómicas e oferecendo o potencial para análise da biogénese lisossómica. Estudos preliminares indicaram que a enzima recombinante é sintetizada muito rapidamente, sai do retículo endoplasmático em 5-10 min após a sua síntese e é segregada 45-60 min mais tarde. Esta cinética rápida da biossíntese da α -Gal A recombinante permite estudos interessantes envolvendo a biossíntese da enzima lisossómica e oferece uma metodologia que, até à data, apenas encontra rival em sistemas virais. De facto, a α -Gal A recombinante é sintetizada tão rapidamente que um único pulso radioactivo de 3 min é suficiente para marcar suficiente enzima para esses estudos. A secreção inesperadamente específica de apenas a α -Gal A recombinante sobre-produzida e não outras enzimas lisossómicas parece análoga à "secreção dependente da dosagem de gene" descrita por Rothman, *et al*, (Stevens *et al*, 1986, *J. Cell Biol.* 102: 1551; Rothman *et al*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3248) e coloca questões interessantes que podem ser avaliadas neste sistema.

5.2.5. GLICOFORMAS MODIFICADAS DE α -Gal A RECOMBINANTE PARA TERAPIA ENZIMÁTICA NA DOENÇA DE FABRY

Experiências iniciais para avaliar a cinética de depuração e a distribuição nos tecidos de α -Gal A recombinante em ratinhos revelaram 50% de direccionamento ao fígado sendo a restante enzima distribuída a muitos outros tecidos incluindo um direccionamento significativo ao rim, ao coração e à pele. Embora esta distribuição seja semelhante à que foi previamente observada para a forma plasmática da α -Gal A humana em ratinhos, pode ser apropriado modificar a enzima quanto a direccionamento a tecidos alterado. As modificações da α -Gal A recombinante para melhorar o direccionamento a tecidos incluem desglicosilação selectiva das porções hidrato de carbono complexas e de elevado teor de manose ligadas covalentemente à enzima recombinante. Em particular, a invenção inclui a modificação de células hospedeiras que permite a expressão da glicofoma α 2,6-sialilada da enzima, que pode ser facilmente purificada (veja-se a Secção 9, *infra*). Por exemplo, quando se utilizam células CHO para expressar a α -Gal A, as células CHO podem ser co-transfectadas com uma construção do gene da α 2,6-sialiltransferase que fornece a função em falta à célula CHO de modo a expressar a glicofoma α -2,6-sialilada da α -Gal A.

Alternativamente, é considerada a desglicosilação sequencial em várias glicofomas para utilização no tratamento da doença de Fabry. Estas modificações provaram-se importantes no direccionamento eficaz de β -glucocerebrosidase para macrófagos no tratamento da doença de Gaucher (Barton, N.W., *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1913). Nesse caso, β -glucocerebrosidase derivada de placenta foi sequencialmente tratada com neuraminidase, β -galactosidase e N- β -acetilglucosaminidase para expor resíduos de manose terminais para assimilação pelo receptor de manose destas células (Stahl, *et al.*, em The Molecular Basis of Lysosomal Disorders, Barranger, J.A. e Brady, R.O. eds., 1984 Academic Press, NY pp. 209-218).

As modificações na α -Gal A humana recombinante incluem, mas não se lhes limitam, desglicosilação sequencial por neuraminidase para expor galactose terminal; tratamento com

β -galactosidase para expor resíduos N- β -acetilglucosaminilo; e tratamento com N- β -acetilglucosaminidase para expor resíduos de manose para direcionamento e assimilação específicos por vários tipos de células. As glicoformas de α -Gal A recombinante sequencialmente desglicosiladas podem ser analisadas determinando a cinética de depuração e a distribuição nos tecidos de cada uma das glicoformas marcadas radioativamente após administração intravenosa em ratinhos e macacos.

A desglicosilação de α -Gal A recombinante pode ser realizada de várias maneiras. Os métodos gerais de tratamento sequencial por exo-glicosidases que podem ser utilizados são essencialmente os previamente descritos (Murray, G.J., 1987, *Meth. Enzymol*, 149: 25). Por exemplo, resíduos de ácido siálico terminais podem ser removidos por tratamento com neuraminidase covalentemente ligada a agarose; e.g., neuraminidase tipo VI ligada a agarose (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO) pode ser utilizada a 40 U/g para tratar 100 mg de α -Gal A com 8 unidades de neuraminidase conjugada a pH 5,0 durante 4 horas a 37°C. A neuraminidase conjugada pode ser removida por centrifugação. Similarmente, a β -galactosidase (3 Unidades por 100 mg de α -Gal A) purificada a partir de *Streptococcus pneumoniae* pode ser utilizada para remover resíduos de galactose terminais. Finalmente, pode utilizar-se N- β -acetilglucosaminidase de feijão-sabre (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO); e.g., podem misturar-se 3×10^6 unidades com cada alíquota de 100 mg da α -Gal A recombinante durante quatro horas a 37°C. Em cada passo, a enzima recombinante pode ser rapidamente purificada para ficar isenta de enzimas desglicosilantes e isenta de hidrato de carbono por purificação sobre a coluna de afinidade de α -galactosilamina-Sepharose.

Para a análise do destino *in vivo* das várias glicoformas, incluindo estudos da cinética de depuração do plasma e da distribuição nos tecidos, a α -Gal A recombinante pode ser marcada antes da modificação. Por exemplo, a α -Gal A recombinante pode ser radioativamente marcada através de crescimento na linha celular DG5.3 de CHO na presença de [³⁵S]metionina 50 μ Ci/ml (>1000 Ci/mmol) durante 24 horas. A enzima marcada radioativamente segregada pode ser purificada

a partir dos meios colhidos, por cromatografia de afinidade em α -galactosilamina-Sepharose, como previamente descrito. Essencialmente 100% da proteína radioativamente marcada segregada por estas células é α -Gal A que pode então ser utilizada para a geração sequencial das glicoformas.

5.3. UTILIZAÇÕES DA α -GAL A RECOMBINANTE

Os produtos purificados obtidos de acordo com a invenção podem ser vantajosamente utilizados para terapia de substituição enzimática em pacientes com a desordem de armazenamento lisossômico, a Doença de Fabry. Alternativamente, os produtos purificados obtidos de acordo com a invenção podem ser utilizados *in vitro* para modificar α -D-galacto-gliconjugados numa variedade de processos; e.g., para converter eritrócitos do grupo sanguíneo B no grupo sanguíneo O; em processos comerciais que requerem a conversão de açúcares tais como rafinose em sacarose ou melibiose em galactose e glucose; etc. Estes são discutidos com maior detalhe nas subsecções adiante.

5.3.1. TERAPIA ENZIMÁTICA COM α -Gal A NA DOENÇA DE FABRY

Entre os erros de metabolismo inatos, os estudos de pacientes com desordens de armazenamento lisossômico proporcionaram um entendimento básico da biologia do aparelho lisossômico e suas hidrolases, a sua biossíntese e processamento (Rosenfeld, *et al*, 1982, *J. Cell Biol.* 93: 135; Lemansky, *et al*, 1984, *J. Biol. Chem.* 259: 10129), os mecanismos do seu transporte para os lisossomas (Neufeld, *et al*, 1975, *Ann. Rev. Biochem.* 44: 357; Sly *et al*, 1982, *J. Cell Biochem.* 18: 67; Kornfeld, S., 1986, *J. Clin. Invest.* 77: 1), e seus requisitos de cofactores (Verheijen, *et al*, 1985, *Eur. J. Biochem.* 149: 315; d'Azzo, *et al*, 1982, *Eur. J. Biochem.* 149: 315; Mehl, *et al*, 1964, *Physiol. Chem.* 339: 260; Conzelman, *et al*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3979). Das mais de 30 desordens de armazenamento lisossômico, a doença de Fabry é um candidato ideal para a aplicação das técnicas de ADN recombinante aqui descritas para avaliar e utilizar várias abordagens terapêuticas em sistemas modelo, bem como para correlacionar os efeitos de alterações específicas de locais na estrutura e função da enzima. A

doença não tem envolvimento no sistema nervoso central; assim, a barreira sangue/cérebro não representa um obstáculo à terapia de substituição enzimática. A enzima defectiva, a α -Gal A, é um homodímero (Bishop & Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307), em contraste com algumas enzimas lisossómicas que possuem diferentes subunidades tais como a β -hexosaminidase A (Mahuran, et al, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1602); portanto, é necessário obter apenas um único produto génico. O defeito metabólico em fibroblastos de cultura da doença de Fabry foi corrigido *in vitro* através da adição de enzima exógena ao meio de cultura (Cline, et al, 1986, *DNA* 5: 37). Também foram identificadas variantes atípicas com a doença de Fabry, estes machos são clinicamente assintomáticos, possuindo actividade de α -Gal A residual suficiente (3 a 10%) para os proteger das principais manifestações mórbidas da doença (Lemansky, et al, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 2062; Clarke, et al, 1971, *N. Engl. J. Med.* 284: 233; Romeo, et al, 1975, *Biochem. Genet.* 13: 615; Bishop, et al, 1981, *Am. J. Hum. Genet.* 71: 217A; Bach, et al, 1982, *Clin. Genet.* 21: 59; e Kobayashi, et al, 1985, *J. Neurol. Sci.* 67: 179). Finalmente, tal como atrás notado, os ensaios limitados em humanos demonstraram a eficácia bioquímica da substituição enzimática na depleção de substrato em circulação antes da deposição vascular bem como a ausência de complicações imunológicas (Brady, et al, 1973, *N. Engl. J. Med.* 289: 9; Desnick, et al, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5326; Bishop, et al, 1981, *Enzyme Therapy XX*: em "Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases", Callahan, J.W. and Lowden, J.A., (ed), Raven Press, New York, p. 381; Desnick, et al, 1980, *Enzyme Therapy XVII*: em "Enzyme Therapy in Genetic Disease: 2", Desnick, R.J. (ed), Alan, R. Liss, Inc., New York, p. 393).

Nestes estudos, ambas as isoformas, esplénica e plasmática, da enzima α -Gal A, foram administradas intravenosamente. A semivida em circulação da isozima esplénica foi de cerca de 10 min enquanto a da isozima plasmática foi de aproximadamente 70 min. Após cada dose da isozima esplénica, a concentração do substrato acumulado em circulação diminuiu de forma máxima em 15 min. Em contraste, a injeção da isozima plasmática diminuiu os níveis de substrato em circulação gradualmente ao longo de 36-72 horas. Uma vez

que a forma segregada da α -Gal A recombinante parece ser semelhante à isozima plasmática, a forma segregada da enzima recombinante poderá ser eficaz para a depleção e controlo de longo prazo dos níveis de substrato em circulação.

A dose das isozimas plasmática e esplénica parcialmente purificadas, administradas nos ensaios clínicos anteriores foi de 2000 U/kg de peso corporal, ou uma dose equivalente para obter 1 μ g/kg de enzima pura. Como esta dose se provou eficaz para a redução do nível de substrato em circulação, uma dose semelhante da enzima recombinante deverá ter um efeito semelhante. Contudo, a enzima recombinante pode ser administrada numa dosagem que varia de 0,1 μ g/kg a cerca de 10 mg/kg e, preferivelmente de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 2 mg/kg. A capacidade para produzir grandes quantidades da enzima recombinante de acordo com a presente invenção permitirá a avaliação do efeito terapêutico de doses significativamente maiores.

5.3.2. UTILIZAÇÕES IN VITRO DE α -Gal A

A α -Gal A é uma galactosil-hidrolase que possui actividade contra vários oligossacáridos, glicoproteínas, glicopéptidos e glicolípidos com ligações α -galactosídicas terminais. Assim, a enzima pode ser utilizada *in vitro* para modificar estes α -galacto-glicoconjugados. Por exemplo, a α -Gal A recombinante da invenção pode ser utilizada para uma variedade de modificações desejáveis incluindo, mas não se lhes limitando: (a) a conversão de eritrócitos do grupo sanguíneo B em células que expressam o antigénio do grupo sanguíneo O (Harpaz, *et al*, 1977, *Eur. J. Biochem.* 77: 419-426); e (b) a hidrólise de estaquiase em rafinose, de rafinose no dissacárido sacarose, ou a hidrólise de melibiose em galactose e glucose (Silman, *et al*, 1980, *Biotechnol. Bioeng.* 22: 533). Estas hidrólises têm aplicações comerciais, tais como na degradação de melaços como substrato para a produção de leveduras (Liljestrom-Suominen, *et al*, 1988, *Appl. Environ. Micro.* 54: 245-249).

6. EXEMPLO COMPARATIVO: SOBRE-EXPRESSÃO E SECREÇÃO ESPECÍFICA DE α -GALACTOSIDASE A BIOLOGICAMENTE ACTIVA NUM SISTEMA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

As subsecções adiante descrevem a produção de grandes quantidades de α -Gal A recombinante humana. Um ADNc de comprimento completo que codifica α -Gal A humana foi inserido no vector de expressão p91023(B) em frente do ADNc amplificável da di-hidrofolato-redutase (DHFR). A integridade funcional da construção de ADNc (p91-AGA) foi confirmada por expressão transiente de enzima activa em células COS-1; 650 U/mg (nmol/hora) *versus* níveis endógenos de -150 U/mg de actividade de 4-MU- α -D-galactopiranosídeo. A construção p91-AGA foi introduzida por electroporação em células CHO DG44 dhfr⁻. A selecção positiva em meio sem nucleósidos resultou no isolamento de clones que expressam a enzima activa em níveis que variam de 300 a 2000 U/mg. Os subclones seleccionados, crescidos em concentrações crescentes de metotrexato (MTX, 0,02 a 1,3 μ M) para co-amplificar os ADNc de DHFR e α -Gal A, expressaram níveis intracelulares de actividade de α -Gal A que variavam de 5000 a 25 000 U/mg. Notavelmente, o subclone DG44.5, que expressava elevados níveis intracelulares de α -Gal A, segregou mais de 80% da enzima recombinante total produzida. A uma concentração de MTX de 500 μ M, 10⁷ células segregaram -15 000 U/ml de meio de cultura/dia. É de notar que as enzimas lisossómicas endógenas de CHO não foram segregadas, incluindo β -hexosaminidase, α -manosidase, β -galactosidase e β -glucuronidase, indicando que a secreção foi específica de α -Gal A e não devida a saturação da via mediada pelos receptores de manose-6-fosfato. Utilizando um biorreactor de fibras ocas, foram produzidos, por dia, até 5 mg por litro por dia de enzima α -Gal A recombinante. A α -Gal A segregada foi purificada por cromatografia de afinidade para caracterização de várias propriedades físicas e cinéticas. A α -Gal A recombinante tinha um pI, uma mobilidade electroforética e valores de Km que eram similares aos da enzima purificada a partir de plasma humano. Em adição, estudos de marcação com ³²P revelaram que ambas as formas, lisossómica e segregada, estavam fosforiladas, presumivelmente nas suas porções oligossacarídicas. Estudos correntes estão dirigidos à caracterização de propriedades cinéticas e físicas adicionais, às porções oligossacarídicas e à estrutura cristalina da

enzima recombinante. Adicionalmente, a disponibilidade de grandes quantidades de enzima activa solúvel irá permitir a avaliação da substituição enzimática em sistemas animais antes de ensaios clínicos em hemizigotas com doença de Fabry.

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1. MATERIAIS

As endonucleases de restrição, o fragmento de Klenow de ADN-polimerase I, a polimerase de T4 e a ligase de T4 foram de New England Biolabs; os α e γ - ^{32} [P] dNTP (3000 Ci/mole) e α^{35} [S]dATP (100 Ci/mole) foram de Amersham. A linha celular COS-1 foi adquirida à ATCC, Rockville, MD. A linha celular CHO DG44 dhfr⁻ está descrita (Urlaug, *et al.*, 1986, *Somat. Cell Genet.* 12:555-566).

6.1.2. CONSTRUÇÃO DE VECTOR DE EXPRESSÃO p91-AGA

O plasmídeo pcDAG126 (Bishop, *et al.*, 1988, em, *Lipid Storage Disorders*, Salvayre, R., Douste-Blazy, L. Gatt, S. Eds. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 809 to 822) contendo o ADNc de α -Gal A de comprimento completo foi digerido com Bam HI e Pst I e o fragmento inserido de 1,45 kb foi purificado por electroforese em gel de agarose. O ADNc foi então subclonado à força no plasmídeo pGEM-4 nos locais Bam HI e Pst I resultando no pGEM-AGA126. Este plasmídeo foi então digerido com Hind III, preenchido nas extremidades utilizando Klenow e ligado a ligantes Eco RI. Após digestão com Eco RI, o fragmento de 1,45 kb foi purificado como acima e clonado no local Eco RI do vector de expressão em mamífero p91023(B) (Wong *et al.*, 1985, *Science* 228:810) resultando o p91-AGA (FIG. 1G).

6.1.3. CULTURA CELULAR, ELECTROTRANSFEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO GÉNICA

Mantiveram-se células COS-1 e CHO DG44 a 37°C em 5% de CO₂ em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro de vitelo fetal (FCS) e antibióticos; mantiveram-se as células DG44 (dhfr⁻) por adição de hipoxantina 0,05 mM e timidina 0,008 mM aos meios. Após a transfecção, as linhas de

CHO recombinantes foram crescidas em DMEM suplementado com 10% de FCS dialisado na ausência ou na presença de MTX.

Para a electroporação, trataram-se as células com tripsina e centrifugaram-se a 800 x g à temperatura ambiente durante 10 min. Lavou-se a pelete uma vez com DMEM suplementado com 10% de soro FCS e duas vezes com tampão de electroporação gelado (sacarose tamponada com fosfato; sacarose 272 mM, fosfato de sódio 7 mM, pH 7,4, contendo MgCl_2 1 mM). Ressuspenderam-se então as células em sacarose tamponada com fosfato a $\sim 0,65$ a $1,0 \times 10^7/\text{ml}$. Colocou-se a suspensão celular (0,8 ml) numa cuvete de espaçamento de 0,4 cm (Bio-Rad), adicionaram-se 5-20 μg de ADN plasmídico e manteve-se em gelo durante 10 min. Colocou-se a cuvete na câmara do "Gene Pulser" (Bio-Rad) e pulsou-se uma vez a 25 μF com 300 V para células COS-1 ou 400 V para células CHO DG44 (dhfr^-), as configurações optimizadas para as linhas celulares respectivas. Colocou-se a cuvete contendo as células pulsadas em gelo durante 10 min e depois removeram-se as células da cuvete e colocaram-se em 15 ml de DMEM suplementado com 10% de FCS.

Para a expressão transiente, colheram-se as células COS-1 a 72 horas e ensaiaram-se imediatamente. Para a expressão estável, cresceram-se as células DG44 transfectadas durante 48 horas e depois removeram-se da placa de cultura por tripsinização e replaquearam-se numa razão de 1:15 em DMEM suplementado com 10% de FCS dialisado. Substituiu-se o meio de quatro em quatro dias. Após duas semanas de crescimento, ficaram visíveis focos de células e isolaram-se clones individuais com anéis de clonagem. Os clones que expressavam os níveis mais elevados de $\alpha\text{-Gal A}$ foram submetidos a amplificação *en masse* por crescimento por passos em concentrações crescentes de metotrexato (MTX), 0,02, 0,08, 1,3, 20, 40, 80, 250 e 500 μM .

6.1.4. ENSAIOS À ENZIMA E À PROTEÍNA

Para o ensaio à enzima, as células numa placa de cultura de 100 mm foram lavadas duas vezes com 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e raspadas para um tubo cónico de 12 ml utilizando um polígio de borracha. Após centrifugação a 800 x g durante 10 min, ressuspenderam-se as células em 1 ml

de tampão de NaPO_4 25 mM, pH 6,0, e depois submeteram-se a ruptura num aparelho de ultra-sons Branson com três impulsos de 15 segundos a 70% de potência de saída. O material tratado com ultra-sons foi centrifugado a 10 000 x g durante 15 min a 4°C e removeu-se o sobrenadante e ensaiou-se imediatamente. Alternativamente, para um rastreio rápido, lavaram-se as células como acima e adicionou-se 1 ml de tampão de lise (tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, contendo NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 a 1% e PMSF 0,2 mM) à placa. Incubaram-se as células lisadas a 4°C durante 30 min, colheram-se os lisados e transferiram-se para um tubo de 1,5 ml, centrifugaram-se numa microcentrífuga e depois removeu-se o sobrenadante para o ensaio.

Determinaram-se as actividades de α -Gal A nos lisados celulares e nos meios utilizando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosídeo (4MU- α -Gal) 5 mM como previamente descrito (Bishop, *et al.*, 1980, em *Enzyme Therapy in Genetic Diseases*: 2. Desnick, R.J. (Ed.). Alan R. Liss, Inc. New York, p. 17). Resumidamente, uma solução de reserva de 4MU- α -Gal 5 mM foi preparada em tampão de citrato 0,1M/fosfato 0,2M, pH 4,6, num banho ultra-sónico. A mistura reaccional, contendo 10 a 50 μ l de extracto celular e 150 μ l da solução de reserva de substrato, foi incubada a 37°C durante 10 a 30 min. A reacção foi terminada com a adição de 2,3 ml de etilenodiamina 0,1 M. Determinou-se a fluorescência utilizando um Fluorómetro Turner modelo 111. Uma unidade de actividade é a quantidade de enzima que hidrolisa uma nmol de substrato por hora. As actividades de α -manosidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase, β -glucuronidase e fosfatase ácida foram determinadas utilizando o substrato de 4-metilumbeliferilo apropriado. Determinaram-se as concentrações de proteína pelo método da fluorescamina (Bohlen, *et al.*, 1973, *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 213) como modificado por Bishop *et al.* (Bishop, *et al.*, 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 524: 109).

6.2. RESULTADOS

6.2.1. EXPRESSÃO DE α -Gal A HUMANA EM CÉLULAS COS-1

O ADNc de α -Gal A humana de comprimento completo foi clonado no vector de expressão p91023(B) (Wong, *et al.*, 1985, *Science* 228: 810) e a construção, designada p91-AGA, foi

introduzida em células COS-1 por electroporação. Foram detectados níveis aumentados de actividade de α -Gal A a 24, 48 e 72 horas após transfecção (FIG. 2A), indicando a integridade funcional da construção p91-AGA. A 72 horas após transfecção, a actividade de α -Gal A aumentou cerca de quatro vezes, enquanto não se observou aumento na actividade de α -Gal A em células transfectadas com o vector p91023(B) contendo o ADNc de α -Gal A na orientação anti-sentido, nem nas células que não receberam ADN. Em adição, os níveis de β -galactosidase, determinados como controlo de enzimas lisossómicas, não foram alterados (FIG. 2B).

6.2.2. TRANSFECCÃO E AMPLIFICAÇÃO DE α -Gal A EM CÉLULAS CHO DHFR⁻

Obtiveram-se clones recombinantes que expressam estavelmente α -Gal A humana por electrotransfecção da construção p91-AGA em células CHO DG44 dhfr⁻ e amplificação do ADN do vector integrado com selecção em concentrações crescentes de MTX. O crescimento inicial em meios sem nucleósidos resultou na identificação de mais de 100 clones que expressam α -Gal A em níveis que variam de 100 a 1800 U/mg de proteína (Tabela I). Os clones com o nível mais elevado de α -Gal A foram crescidos na presença de MTX 0,02 a 0,08 μ M para amplificar o ADN de p91-AGA integrado. A Tabela II mostra que os níveis intracelulares de α -Gal A em clones amplificados representativos aumentaram 2 a 6 vezes em MTX 0,02 μ M e até 10 vezes quando adicionalmente amplificados em MTX 0,08 μ M.

TABELA I

Actividade de α -Galactosidase A Intracelular Em Células CHO
DG44 (dhfr⁻) * Após Electrotransfecção com p91-AGA

CLONE	Actividade de α -Gal A (U/mg de proteína)
DG44 Progenitora:	497
Transfectada:	
4	493
5	1243
7	108
8	524
9	1155
11	1115
20	624
24	1864
46	720
52	180

* Células crescidas em DMEM suplementado com 10% de FCS dialisado.

TABELA II

Actividades de α -Galactosidase A Intracelular Em Células CHO
DG44 (dhfr⁻) Transfectadas Com p91-AGA Após Amplificação
Inicial Em Metotrexato

CLONE	α -Gal A (U/mg)
<u>MTX 0,02 μM:</u>	
5	4990
9	2900
11	3170
46.1	1230
46.5	4570
46.12	4100
<u>MTX 0,08 μM:</u>	
5.3	23 400
5.7	7950
5.9	14 680
5.11	3070
9.1	10 290
9.4	7950
9.6	3860

6.2.3. CLONES DE ELEVADO NÍVEL DE EXPRESSÃO SEGREGAM α -Gal A HUMANA

Entre os clones positivos amplificados na presença de MTX 0,08 μ M, o clone 5.3 teve o nível mais elevado de α -Gal A intracelular (Tabela II) e portanto foi escolhido para amplificação adicional. Quando crescido na presença de MTX 1,3 μ M, a actividade de α -Gal A no meio de crescimento do clone DG5.3 foi determinada como sendo 2500 U/ml, ou 25 vezes maior do que o nível em células DG44 progenitoras não transfectadas (50 a 100 U/ml). O crescimento na presença de concentrações crescentes de MTX, resultou em actividades de α -Gal A intracelulares e segregadas aumentadas (Tabela III). É interessante que mais de 80% da α -Gal A total produzida foi segregada e o crescimento em concentrações crescentes de MTX continuou a aumentar a percentagem de enzima segregada. Note-se que os resultados mostrados na Tabela III foram obtidos após as células serem amplificadas na presença da concentração indicada de MTX e depois ensaiadas quanto a actividade de α -Gal A após crescimento durante três semanas na ausência de MTX, o que explica as suas actividades intracelulares menores do que durante o crescimento sob pressão selectiva (Pallavicini, *et al.*, 1990, *Mol. Cell Biol.* 10: 401; Kaufman, R.J., 1990, *Meth. Enzymol.* 185: 537; Kaufman, R.J., 1990, *Meth. Enzymol.* 185: 487).

TABELA III

Actividades de α -Galactosidase A Intracelular E Segregada Na Linha DG5.3 de CHO Transfectada com p91-AGA Após Amplificação Por Passos Em Metotrexato. Os Resultados Foram Obtidos Em Clones Após Três Semanas De Crescimento Na ausência De Metotrexato.

Concentração de Metotrexato (μ M)	Células CHO (U/mg)	Meio* (U/ml)
DG44 não transfectada:	250	100
Transfectada com p91AGA5-3:		
0,00	375	150
0,02	550	265
0,08	600	560
1,3	2,560	2,090
20	6,270	6,530
40	5,795	6,855
80	6,365	8,750
250	5,720	9,945
500	12,560	18,140

* 10^7 células e 10 ml de meio para cada concentração de Metotrexato.

6.2.4. SECREÇÃO ESPECÍFICA DE ENZIMAS LISOSSÓMICAS SOBRE-EXPRESSAS

Para determinar se a secreção de α -Gal A foi devida a saturação dos receptores para direccionamento lisossómico, o meio de cultura do clone DG5.3 foi ensaiado quanto à presença de outras enzimas lisossómicas. Como mostrado na Tabela IV, as actividades de sete enzimas lisossómicas representativas não foram aumentadas ou eram menores que as dos meios da linha celular progenitora DG44, indicando que a secreção por DG5.3 de α -Gal A era específica.

Para determinar se a secreção era específica do clone DG5.3, outro clone, o DG9, que não segregava α -Gal A (*i.e.*, a actividade no meio era de 120 U/ml), foi submetido a crescimento por passos em concentrações crescentes de MTX (*i.e.*, de MTX 0,02 a 20 μ M). Após amplificação em MTX 20 μ M, o

clone DG9 tinha níveis intracelulares e segregados de actividade de α -Gal A de 9400 U/mg e 7900 U/ml, respectivamente; i.e. 89% da actividade total de α -Gal A produzida foi segregada.

TABELA IV

Actividades De Enzimas Lisossómicas Segregadas Em Meios de Cultura De Células CHO Transfectadas

Enzima Lisossómica	Linha Celular CHO	
	Controlo de DG44*	α -Gal A 5-3 ₂₅₀ *
α -Galactosidase A	56	16 900
α -Arabinosidase	2,4	0,9
α -Fucosidase	341	358
β -Galactosidase	35,2	8,9
β -Gaucuronidase	90,0	53,7
β -Hexosaminidase	2290	2090
α -Manosidase	147	82,8
Fosfatase Ácida	30,6	6,1
* Média de Determinações em Triplicado em Duas Experiências Independentes.		

Como se mostrou que o tratamento de células CHO recombinantes com butirato 50 mM aumenta especificamente a transcrição do vector p91023(B) integrado estavelmente em células CHO (Dorner, et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 20602; Andrews & Adamson, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 5461) outro clone transfectado, DG11, que não foi amplificado, foi crescido na presença de butirato 5 mM (Tabela V). Os níveis intracelulares de actividade de α -Gal A aumentaram de 259 U/mg para 687 U/mg. Notavelmente, na presença de butirato, a actividade de α -Gal A aumentada foi segregada para o meio (103 a 675 U/ml), sugerindo que a secreção ocorreu quando o número de cópias do gene aumentou (ou, mais precisamente, o estado estacionário de ARNm de α -Gal A foi aumentado). A incubação de células induzidas por butirato com M-6-P 5 mM (para prevenir a recaptura da enzima segregada pelo receptor da superfície celular) não resultou num aumento significativo na quantidade de α -Gal A segregada.

TABELA V

Efeito do Butirato sobre a Secreção de α -Gal A em CHO DG11		
Clone	Actividade de α -Gal A	
	Células	Meio
	(U/mg)	(U/ml)
Controlo	259	102.6
Butirato	687	675
Butirato + M-6-P 5 mM	604	700

6.2.5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO NA SECREÇÃO

Para determinar se a concentração de soro do meio de crescimento tinha um efeito nos níveis de secreção de α -Gal A recombinante, o clone DG5.3 foi crescido em placas de cultura de 100 mm a uma densidade de 5×10^6 células por placa, na presença de 0% a 10% de FCS dialisado durante 5 dias. Não houve efeito aparente sobre a secreção de α -Gal A em células crescidas com 2,5% a 10% de soro (FIG. 3A-3B). O nível diminuído de secreção pelas células DG5.3 cultivadas em 0% e 1% de soro reflectia presumivelmente o fraco crescimento destas células.

6.2.6. PRODUÇÃO EM BIORREACTORES

Para produzir grandes quantidades de α -Gal A humana recombinante, 10^8 células do clone DG5.3 que tinham sido crescidas na presença de MTX 500 μ M (DG5.3₅₀₀), foram utilizadas para semear um biorreactor de fibras ocas. Como mostrado na FIG. 4, o nível de α -Gal A produzida aumentou para cerca de 10 000 U/ml por dia. Este nível permaneceu constante durante cerca de três meses. Em adição, a concentração de soro necessária para estas células no biorreactor foi diminuída por passos até 1% sem grande diminuição da produção de α -Gal A (FIG. 4). Uma única operação de 90 dias deste biorreactor resultou em >350 mg de α -Gal A recombinante activa segregada para o meio de cultura.

6.3. DISCUSSÃO

Para a α -Gal A humana, modificações pós-tradução parecem ser essenciais para a estabilidade e actividade, como evidenciado pelo facto de que a enzima não glicosilada expressa em *E. coli* era instável e rapidamente degradada (Hantzopoulos & Calhoun, 1987, *Gene* 57: 159). Em adição, a subunidade de α -Gal A, que tinha quatro potenciais locais de N-glicosilação, sofre modificação e fosforilação de hidratos de carbono para entrega lisossómica (Lemansky, et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 2062). A caracterização prévia de α -Gal A purificada a partir de plasma e tecido identificou as suas diferentes composições em hidratos de carbono, sendo que a glicoforma plasmática possuía mais resíduos de ácido siálico (Bishop, et al., 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 524: 109; Bishop, et al., 1980, *Birth Defects* 16:1; p. 17; Bishop e Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:1307). Adicionalmente, ensaios clínicos de terapia enzimática revelaram que, comparativamente com a forma derivada dos tecidos, a glicoforma plasmática tinha uma retenção prolongada na circulação e foi mais eficaz na depleção do substrato acumulado em circulação após administração intravenosa a pacientes com doença de Fabry (Desnick, et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5326). Assim, a expressão amplificada de α -Gal A humana em células CHO foi escolhida para a expressão desta enzima recombinante cuja composição nativa inclui resíduos galactosilo e de ácido siálico (Ledonne, et al., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.* 224:186).

Embora esta seja a primeira hidrolase lisossómica humana a ser sobre-expressa com sucesso, a secreção de mais de 80% da enzima produzida foi uma verificação inesperada. Isto pode resultar de vários mecanismos diferentes incluindo (a) saturação das vias de receptores de manose-6-fosfato; (b) uma mutação que altera um local de glicosilação crítico; (c) não exposição da porção manose-6-fosfato para ligação aos receptores; ou (d) uma invulgarmente baixa afinidade da α -Gal A recombinante pelo receptor de manose-6-fosfato (Reitman & Kornfeld, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 11977; Lang, et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259: 14663; e, Gueze, et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101: 2253; para revisão veja-se, Kornfeld & Mellman, 1989, *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 483). Se a secreção de

α -Gal A foi devida à saturação da via mediada por receptores, então seria de esperar que as outras enzimas lisossómicas endógenas também fossem segregadas. Contudo, os níveis de hidrolases de CHO segregadas estavam inalterados, ou diminuídos (Tabela IV). Para excluir uma possível mutação no ADNc de α -Gal A introduzido durante a construção e a integração do vector (Calcs, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015), o ADN do vector integrado foi amplificado através da reacção em cadeia pela polimerase. Dez subclones foram completamente sequenciados e ambas as orientações, e não foram identificadas mutações. Em estudos acompanhantes da proteína recombinante purificada (descritos *infra*), mostrou-se que a porção manose-6-fosfato estava presente na enzima e que a enzima se ligou eficientemente ao receptor de manose-6-fosfato imobilizado. Adicionalmente, para provar que a secreção desta proteína no sistema de expressão utilizada não era dependente de α -Gal A, o ADNc que codifica outra hidrolase lisossómica, a α -N-acetilgalactosaminidase, foi inserido em p91023(B) e amplificado em células CHO. Analogamente às observações com α -Gal A, as células que eram grandes expressores de α -N-acetilgalactosaminidase (α -GalNAc), também segregaram a enzima recombinante no meio.

A presença de porções manose-6-fosfato funcionais na enzima segregada implicava que talvez um mecanismo diferente fosse responsável pela sua secreção. De facto, muitas outras proteínas segregadas mostraram conter manose-6-fosfato. Algumas destas proteínas incluem proteínas lisossómicas enquanto a localização de outras não é clara. Estas proteínas incluem, proliferina (Lee & Nathans, 1988, J. Biol. Chem. 263: 3521) segregada por linhas celulares placentárias de ratinho em proliferação; receptor do factor de crescimento epidérmico em células A-431 (Todderud & Carpenter, 1988, J. Biol. Chem. 263: 17893); factor de crescimento de transformação β 1 (Purchio, et al., 1988, J. Biol. Chem. 263: 14211); uteroferrina, uma fosfatase ácida contendo ferro segregada em grandes quantidades pelo endométrio uterino de porcas (Baumbach, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2985); e catepsina L (MEP), uma cisteína-protease lisossómica de ratinho segregada por fibroblastos NIH 3T3 de ratinho (Sahagian & Gottesman, 1982, J. Biol. Chem. 257: 11145). Tem interesse o facto de que a transformação de células NIH 3T3

com vírus Kirstein resulta num aumento de 25 vezes na síntese de MEP fazendo com que esta enzima seja selectivamente segregada apesar de conter porções manose-6-fosfato funcionais (Sahagian & Gottesman, 1982, J. Biol. Chem. 257: 11145). Recentemente, o mecanismo para a secreção selectiva de MEP foi identificado e envolve uma inerente baixa afinidade de MEP para com o receptor de manose-6-fosfato (Dong, et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 7377).

É também notável o facto de que a sobre-expressão dirigida por plasma de carboxipeptidase Y vacuolar de levedura, em levedura, resulta em mais de 50% da proteína normalmente glicosilada segregada na forma precursora (Stevens, et al., 1986, J. Cell. Biol. 102: 1551). Observaram-se verificações similares para o gene da proteinase A de levedura (Rothman, et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3248). Estudos sugeriram que as glicoproteínas precursoras têm sinais de localização subcelular localizados no interior do propéptido N-terminal que são reconhecidos pela via de secreção, desse modo impedindo a entrega ao vacúolo do tipo lisossómico. É notável que a secreção destes genes de levedura é dependente da dosagem do gene e que se observa um fenómeno similar para a expressão em células CHO de α -Gal A humana. Igualmente, tem interesse o facto de que a forma precursora das enzimas de levedura foi segregada. A forma plasmática de α -Gal A é mais sialilada e segregada, e outros mostraram que as enzimas lisossómicas em urina humana são as formas precursoras (Oude-Elferink, et al., 1984, Eur. J. Biochem. 139: 489). Contudo, a sequenciação N-terminal de α -Gal A recombinante expressa por DG44.5 revelou que o terminal amino era idêntico ao da α -Gal A purificada a partir de pulmão humano (Bishop, et al., 1986, Proc. Natl. Acad. USA 83:4859). Assim, é possível que o elevado nível de expressão de hidrolases lisossómicas humanas resulte na sua secreção devido à incapacidade de modificar o precursor e/ou à incapacidade da maquinaria de localização subcelular acomodar a entrega intracelular da glicoproteína sobre-expressa. Contudo, isto novamente resultaria na secreção de outras enzimas lisossómicas. Como nenhuma das outras enzimas lisossómicas são detectadas nos meios de cultura, é menos provável que a secreção de α -Gal A resulte da saturação de um componente da maquinaria de localização subcelular.

Estudos adicionais, dirigidos a determinar diferenças de aminoácidos, hidratos de carbono ou outras diferenças (e.g., sulfatação) entre as formas segregada e intracelular de α -Gal A recombinante, podem proporcionar esclarecimentos sobre o mecanismo subjacente a erros de localização e secreção selectiva de α -Gal A humana. Em adição, esforços para avaliar a generalidade desta observação deverão incluir a sobre-expressão de outras enzimas lisossómicas humanas. O facto de grandes quantidades de α -Gal A humana recombinante serem segregadas pelas células CHO permite a conveniente produção da enzima recombinante. A Secção 8, *infra*, descreve um método para a purificação da enzima recombinante e a caracterização das suas propriedades físicas e cinéticas incluindo a sua assimilação mediada por receptores por fibroblastos de Fabry.

7. EXEMPLO COMPARATIVO: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROCESSAMENTO DE α -GALACTOSIDASE A RECOMBINANTE

As subsecções adiante descrevem a purificação de α -galactosidase A humana clonada no vector de expressão eucariota amplificável p91023(B), e sobre-expressa em células de ovário de *hamster* chinês (CHO). A proteína enzima recombinante, foi selectivamente segregada para o meio de cultura e mais de 200 mg foram purificados até à homogeneidade através de um procedimento de cromatografia líquida de proteína rápida incluindo cromatografia de afinidade em α -galactosilamina-Sepharose. A enzima segregada purificada era uma glicoproteína homodimérica com pesos moleculares nativos e de subunidade de cerca de 110 e 57 kDa, respectivamente. A enzima recombinante tinha um pI de 3,7, um pH óptimo de 4,6, e uma K_m de 1,9 mM no sentido do 4-metilumbelliferil- α -D-galactopiranosídeo. Rapidamente hidrolisou pireno-dodecanoílesfingosil-tri-hexósido, um análogo marcado com fluorescência do substrato glicosfingolipídico natural, que foi direccionado com apolipoproteína E para os lisossomas das células CHO produtoras de enzima. Estudos pela técnica "Pulse-Chase" indicaram que a enzima recombinante assumiu a sua estrutura secundária definida por dissulfureto em <3 min, estava no Golgi em 5 min onde se tornou resistente a Endo H e foi segregada para o meio em 45-60 min. Ambas as formas, intracelular e segregada, estavam fosforiladas. A subunidade

da enzima segregada era ligeiramente maior do que a subunidade intracelular. Contudo, após tratamento com endoglicosidase, ambas as subunidades co-migraram em SDS-PAGE, indicando diferenças nas porções oligossacarídicas das duas formas. O tratamento da enzima segregada radioactivamente marcada com várias endoglicosidasas revelou a presença de três cadeias oligossacarídicas ligadas a N, dois tipos de elevado teor de manose (sensíveis a Endo H) e um tipo complexo, este último sendo resistente a Endo H e F. Análises dos oligossacáridos libertados por Endo H revelaram que um tinha dois resíduos de fosfato que se ligaram especificamente a receptores de manose-6-fosfato imobilizados enquanto o outro era uma estrutura híbrida contendo ácido siálico. Estas propriedades físicas e cinéticas e a presença de cadeias oligossacarídicas do tipo complexo na enzima segregada recombinante eram similares às da enzima nativa purificada a partir de plasma humano. A forma segregada de α -Gal A foi assimilada por fibroblastos de Fabry de cultura através de um processo saturável que foi bloqueado na presença de manose-6-fosfato 2 mM indicando que a ligação e a internalização eram mediadas pelo receptor de manose-6-fosfato. Os perfis de ligação da enzima recombinante segregada e da α -Gal A segregada por fibroblastos humanos tratados com NH_4Cl ao receptor imobilizado eram idênticos. A produção de grandes quantidades de α -Gal A recombinante, activa, solúvel, que é similar em estrutura à enzima nativa isolada do plasma, permitirá uma comparação adicional com as formas nativas da enzima e a avaliação clínica da substituição enzimática na doença de Fabry.

7.1. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1. MATERIAIS

A endo- β -N-acetilglucosaminidase H (Endo H), a endo- β -N-acetilglucosaminidase D (Endo D), a endoglicosidase F (Endo F) e a péptido:N-glicosidase F (PNGase F) foram obtidas de Boeringer Mannheim, Indianapolis, IN. A [^{35}S]-metionina (>1000 Ci/mmol), a D-[2,6- ^3H]-manose (60 Ci/mmol), o ^{32}P -Fósforo (10 mCi/ml) e o Amplify foram obtidos de Amersham, Arlington Heights, IL. A pansorbina foi obtida de Calbiochem, San Diego, CA. Os glicósidos 4-MU foram obtidos de Genzyme, Cambridge, MA. Os adjuvantes de Freund, a esfingomiélin (do cérebro) e o fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) foram

obtidos de Sigma, St. Louis, MO. A QAE Sephadex, a Sephadex G-25, a octil-Sepharose e a Superose 6 foram obtidas de Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ. As placas de sílica de TLC (cat. 5626) foram adquiridas a EM Science, Gibbstown, NJ. A linha celular COS-1 foi obtida da ATCC. Todos os reagentes de cultura de tecidos foram obtidos de Gibco, Grand Island, NY. O *cocktail* de cintilação Sinti Verse I foi obtido de Fisher, Pittsburgh, PA. O receptor de manose-6-fosfato imobilizado foi obtido do Dr. Stuart Kornfeld, Washington University, St. Louis, MO. O pireno-dodecanoíl-esfingosil-tri-hexósido (P-C₁₂STH) foi obtido do Dr. Shimon Gatt, Hebrew University, Israel. A apolipoproteína E foi obtida de BTG Inc., Ness-Ziona, Israel.

7.1.2. CULTURA CELULAR

As células foram mantidas a 37°C em 5% de CO₂ em Meio de Eagle com Modificação de Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal de vitelo (FCS) e antibióticos. A linha DG44 foi cultivada em DMEM suplementado com HT (hipoxantina, timidina, Sigma) enquanto a linha CHO recombinante DG5.3 recebeu DMEM suplementado com 10% de FCS dialisado. (Kaufman, *et al.*, 1988, J. Biol. Chem. 263: 6352).

7.1.3. PURIFICAÇÃO DE α -Gal A RECOMBINANTE

O meio de cultura de CHO recombinantes foi recolhido (20 L) e concentrado para 500 ml utilizando um concentrador de fluxo tangencial em cassetes Pellicon, com um limite de exclusão de peso molecular de 10 000 daltons (Millipore, MA). O pH do concentrado foi ajustado para 4,7 a 5,0 com HCl 10 N e subsequentemente clarificado por centrifugação a 10 000 x g numa centrífuga refrigerada RC-5 durante 10 min.

Todos os passos cromatográficos foram automatizados num aparelho de FPLC (Pharmacia) e foram realizados à temperatura ambiente. Aproximadamente 100 ml do concentrado de meio (~20 mg da proteína enzima α -Gal A) foram aplicados numa coluna de afinidade de α -Gal A (α -GalNH₂-Sepharose; 2,5 x 8 cm) (Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307) pré-equilibrada com tampão A (citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,7, NaCl 0,15 M). A coluna foi lavada com tampão A até a concentração de proteína no eluato voltar ao nível de antes da aplicação

(~200 ml) e foi eluída com 150 ml de tampão B (citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,0, NaCl 0,15 M, galactose 70,4 mM). O eluato foi recolhido, concentrado para cerca de 20 ml utilizando uma célula de ultrafiltração, limite de exclusão de peso molecular de 30 000 daltons, sob pressão positiva de azoto (Amicon). O concentrado foi misturado com um volume igual de tampão C (Bis-Tris 25 mM, pH 6,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M), centrifugado a 10 000 x g e a pelete que continha até 40% da actividade, foi redissolvida em tampão A e misturada com um volume igual de tampão C e centrifugada como acima. Os sobrenadantes combinados foram aplicados numa coluna de Octil-Sepharose (1,5 x 18 cm) pré-equilibrada com tampão D (Bis-Tris 25 mM, pH 6,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M). A coluna foi lavada como acima até a concentração da proteína de eluição voltar aos níveis de antes da aplicação (~100 ml) e a coluna foi eluída com tampão E (fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0, etilenoglicol a 50%). O produto de três eluições em Octil-Sepharose, totalizando aproximadamente 75 ml, foi concentrado como acima para cerca de 2 ml utilizando um concentrador Amicon. O concentrado foi finalmente aplicado numa coluna de Superose 6 (20-40 μm , Pharmacia, 1,6 x 100 cm) equilibrada em tampão F (fosfato de sódio 25 mM, pH 6,5, NaCl 0,1 M). O pico de α -Gal A foi recolhido, ~20 ml, concentrado como acima e armazenado em tampão F a 4°C.

7.1.4. ENSAIOS À ENZIMA E À PROTEÍNA

A α -Gal A foi ensaiada utilizando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosídeo (4-MU- α -Gal) como descrito previamente (Bishop, *et al.*, 1980, *Em Enzyme Therapy in Genetic Diseases*: 2. Desnick, R.J. (Ed.). Alan R. Liss, Inc. New York, p. 17). Resumidamente, preparou-se uma solução de reserva de 4-MU 5 mM em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,6 solubilizado num banho ultra-sónico. As misturas reaccionais contendo 10-50 μl de preparação de enzima ou extractos celulares e 150 μl de substrato, foram incubadas a 37°C durante 10-30 min. As reacções foram terminadas com a adição de 2,33 ml de etilenodiamina 0,1 M. Uma unidade de actividade é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de substrato/hora.

As digestões com Endo H, Endo D, Endo F e PNGase F foram realizadas como descrito (Tarentino, *et al.*, 1989, *Meth. Cell. Biol.* 32: 111). As amostras foram diluídas para 0,2-0,5% em

SDS antes da digestão. Todos os volumes reacionais foram de 50 µl. Adicionou-se uma gota de tolueno a cada tubo reaccional para prevenir crescimento bacteriano. Resumidamente, as digestões com Endo H (5 mU/reacção) foram realizadas a 37°C durante a noite em citrato de sódio 5 mM, pH 5,5 e PMSF 0,2 mM. As digestões com Endo D (10 mU/reacção) foram realizadas a 37°C durante a noite em tampão de citrato e fosfato 0,2 M, pH 6,0 e PMSF 0,2 mM. As digestões com Endo F (50 mU/reacção) foram realizadas durante a noite a 30°C em acetato de sódio 0,17 M, pH 6,0, NP-40 a 1,6% e PMSF 0,2 mM. As digestões com PNGase F (100 mU/reacção) foram realizadas durante a noite a 30°C em fosfato de potássio 0,17 M, pH 8,6, NP-40 a 1,6%, PMSF 0,2 mM.

A concentração de proteína foi determinada pelo método da fluorescamina (Bohlen, *et al.*, 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155: 213) como modificado por Bishop *et al.* (Bishop *et al.*, 1978, Biochim. Biophys. Acta 524: 109) .

7.1.5. ENSAIO DO SUBSTRATO NATURAL IN VIVO

Para este ensaio, misturaram-se 30 nmol de P-C₁₂STH e 70 nmol de esfingomielina numa solução de clorofórmio:metanol (1:1), evaporaram-se sob azoto e secaram-se num Speed-Vac (Savant). A pelete foi ressuspensa em 2 ml de solução salina, tratada com ultra-sons utilizando um aparelho Microson, Heat Systems Ultrasonics, Inc., durante 3-5 min a 40% de potência de saída e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 1 hora. Adicionou-se apolipoproteína E (80 µg) e incubou-se a mistura durante mais 15 min à temperatura ambiente. Adicionaram-se os lipossomas ao meio de cultura de células CHO recombinantes e incubou-se a 37°C numa incubadora com CO₂ durante 1 a 4 horas. As células foram removidas das placas de cultura por tripsinização, lavadas uma vez com DMEM suplementado com 10% de soro fetal de vitelo e duas vezes com solução salina. Ressuspendeu-se a pelete celular em clorofórmio-metanol e aqueceu-se a 60°C durante 10 min e centrifugou-se a 600 x g durante 10 min. Secou-se o sobrenadante sob azoto e ressuspendeu-se a pelete em 100 µl de clorofórmio:metanol. Aplicaram-se as amostras por pontos numa placa de cromatografia de camada fina em sílica-gel e cromatografaram-se em clorofórmio:metanol:água (90:10:1) durante 45 min, seguida de cromatografia em

clorofórmio:metanol:água (75:25:4) durante 30 min. Os produtos foram visualizados sob luz UV (330 nm), excisados da placa por raspagem, ressuspensos em clorofórmio:metanol, e a sua fluorescência foi quantificada num espectrofluorómetro Farrand (excitação a 343 nm, emissão a 378 nm).

7.1.6. ANTICORPOS POLICLONAIS

Um coelho branco da Nova Zelândia (2 kg) foi injectado com 150 µg de α-Gal A esplénica purificada em adjuvante completo de Freund preparada como se segue: adicionaram-se 150 µg de α-Gal A a 0,5 ml de PBS numa seringa de vidro. Utilizando uma agulha de aço inoxidável de calibre 21, misturou-se a solução de PBS/α-Gal A com 0,5 ml de adjuvante completo de Freund numa segunda seringa de vidro, até se obter uma emulsão homogénea. Injectou-se a emulsão em 8 locais subcutâneos diferentes (dorso) e 1 local intramuscular (coxa). Dois meses após a injeção inicial, o coelho recebeu um reforço de 50 µg de α-Gal A em adjuvante incompleto de Freund como acima. Recolheu-se soro da veia da orelha nos dias 8 e 12 após o reforço. Verificou-se o título utilizando um ensaio ELISA padrão (Johnstone & Thorpe, 1982, *Immunochemistry in Practice*. Balckwell Scientific Publications, Oxford). Deram-se reforços subsequentes aproximadamente de dois em dois meses seguidos por uma sangria 10 dias mais tarde. Uma sangria típica rende 30-40 ml de sangue.

7.1.7. SDS-PAGE E AUTORADIOGRAFIA

Realizou-se a electroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (conforme apropriado) como descrito por Laemmli num bloco de 1,5 mm de espessura contendo 10% de acrilamida (Laemmli, U.K., 1970, *Nature* 227: 680). Fixou-se o gel em ácido acético a 10% e metanol a 20% durante 30 min e depois mergulhou-se em Amplify durante 30 min com agitação. Secaram-se os géis sob vácuo durante 90 min (Hoffer) e expuseram-se a Kodak X Omat AR durante 4 a 72 horas.

7.1.8. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉCTRICO E DO pH ÓPTIMO

O ponto isoeléctrico foi determinado utilizando QAE Sephadex essencialmente como descrito por Yang e Langer (Yang

& Langer, 1987, *Biotechniques* 5: 1138). O pH óptimo foi determinado em tampão de fosfato de sódio 25 mM a 37°C.

7.1.9. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM RECEPTOR DE MANOSE-6-FOSFATO E CROMATOGRAFIA EM QAE SEPHADEX

O receptor de manose-6-fosfato de 215 kDa (receptor de M-6-P) acoplado a Affigel-10 estava a uma concentração de 0,4 mg/ml de gel compactado. As amostras, em tampão de ligação (imidazole 50 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 a 0,05%, β -glicerolfosfato de sódio 5 mM, azida de sódio a 0,02%), foram aplicadas numa coluna de 1,5 x 0,8 cm a um caudal de 0,3 ml/minuto. Após a aplicação das amostras (5 ml), lavou-se a coluna com 5 ml de tampão de ligação e eluiu-se com um gradiente não linear de manose-6-fosfato em tampão de ligação (0-5 mM). Este gradiente exponencial (Dong, *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 4210) foi formado por um aparelho que consiste em duas câmaras de 2,5 cm de diâmetro e 1 cm de diâmetro. Foram recolhidas fracções (0,5 ml) e alíquotas de 10 μ l foram ensaiadas quanto a actividade de α -Gal A utilizando 4-MU- α -Gal, e quanto a radioactividade utilizando 10 ml de *cocktail* de cintilação Sinti Verse I.

A cromatografia em QAE Sephadex numa coluna de 3 x 0,8 cm foi realizada como descrito (Varki & Kornfeld, 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 2808; Varki & Kornfeld, 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 10847). Resumidamente, após digestão com Endo H, os oligossacáridos libertados (marcados com [^{3} H]-manose) foram isolados e dessalinizados numa coluna de 18 x 0,8 cm de Sephadex G-25. Aplicaram-se as amostras na coluna de QAE Sephadex e eluíram-se com alíquotas de 5 ml sucessivas de Tris 2 mM, pH 8,0 contendo NaCl 0, 20, 40, 80, 100, 120, 140, 160, 200, 400 e 1000 mM. Os oligossacáridos eluíram de acordo com o número das suas cargas negativas; 0 de carga a NaCl 0 mM, 1 a NaCl 20 mM, 2 a NaCl 70 mM, 3 a NaCl 100 mM e 4 a NaCl 140 mM.

7.1.10. MARCAÇÃO DE CÉLULAS COM [^{31} S]-METIONINA, [^{3} H]-MANOSE E [^{13} P]-FÓSFORO

Culturas confluentes em placas de 100 mm foram lavadas uma vez com 5 ml de DMEM isento de metionina. Colocou-se uma alíquota fresca deste meio (5 ml) em cada placa e incubaram-se as culturas numa incubadora a 37°C durante 30 min.

Removeram-se os meios das placas e adicionou-se uma alíquota fresca de DMEM isento de metionina (1 ml), suplementado com 10% de FCS dialisado e 50-100 μCi de [^{35}S]-metionina. Incubaram-se as células a 37°C durante 3 a 5 min, removeu-se o meio radioactivo e lavaram-se as células duas vezes com DMEM mais FCS. Seguiram-se as células durante os tempos indicados em 5 ml de DMEM mais FCS contendo metionina 2 mM. Para a marcação durante a noite, as culturas receberam 5 ml de DMEM isento de metionina suplementado com FCS dialisado, glutamina, antibióticos, NH_4Cl 10 mM e [^{35}S]-metionina 200 μCi .

Para a marcação com [^3H]-manose, as culturas foram crescidas como acima em DMEM suplementado. Lavaram-se as células com 5 ml de DMEM de baixo teor de glucose e adicionou-se uma alíquota fresca de meio, [^3H]-manose (250 μCi ; seca sob azoto e ressuspensa em DMEM), e incubaram-se as células numa incubadora a 37°C durante 24 horas.

Para a marcação com ^{32}P , mudaram-se as culturas para DMEM isento de fosfato suplementado com 10% de FCS dialisado. Após a adição de [^{32}P]-ortofosfato (1 mCi) incubaram-se as culturas numa incubadora com CO_2 a 37°C durante 24 horas.

7.1.11. LISE CELULAR E IMUNOPRECIPITAÇÃO

Células crescidas em placas de cultura de 100 mm foram lavadas duas vezes com 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e raspadas para tubos cónicos de 12 ml utilizando um polícia de borracha e 10 ml de PBS. Após centrifugação a 2500 rpm durante 10 min ressuspenderam-se as células em 1 ml de NaPO_4 25 mM, pH 6,0, que receberam três impulsos de 15 segundos num aparelho de ultra-sons Branson. Removeram-se os detritos celulares por centrifugação (10 000 x g durante 15 min a 4°C). Alternativamente, lavaram-se as células como acima e adicionou-se à placa 1 ml de tampão de lise (fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP-40 a 1%, PMSF 0,2 mM). Incubou-se a placa de cultura a 4°C durante 30 min e transferiram-se as células para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Removeram-se os detritos celulares como acima.

A imunoprecipitação foi realizada como descrito (Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 18.42-18.46). Resumidamente, colocaram-se 0,5 ml de lisado celular ou meio de cultura num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e adicionaram-se 50 µl de soro de coelho pré-imune. Incubou-se a mistura a 4°C durante 1 hora com agitação suave. Adicionaram-se 50 µl de Pansorbina e continuou-se a incubação durante 30 min. Clarificou-se a mistura por centrifugação a 10 000 x g durante 5 min, adicionaram-se 100 µl de anticorpo policlonal anti- α -Gal A e continuou-se a incubação durante 1 hora a 4°C com rotação suave. Adicionou-se Pansorbina (100 µl) e continuou-se a incubação durante 30 min como acima. Recolheu-se o complexo terciário células de *S. aureus*-anticorpo-antigénio por centrifugação como acima. Rejeitou-se o sobrenadante e lavou-se a pelete sucessivamente com tampão NET (fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 a 1%, gelatina a 0,25%) suplementado com NaCl 0,5 M, em tampão NET com SDS a 0,1% e em tampão TN (Tris 10 mM, pH 7,5, NP-40 a 0,1%). Desnaturou-se a proteína imunoprecipitada por aquecimento a 100°C durante 5 min na presença de SDS a 2%, DTT 100 mM (o DTT não foi utilizado para as experiências que envolviam conformações de estrutura secundária). Removeram-se as células de *S. aureus* por centrifugação a 10000 x g durante 5 min à temperatura ambiente.

7.2. RESULTADOS

7.2.1. PURIFICAÇÃO

A α -Gal A recombinante produzida no biorreactor celular foi purificada a partir do meio em bruto por cromatografia de afinidade em α -GalNH₂-C₁₂-Sepharose (Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307) seguida por cromatografia hidrófoba em Octil-Sepharose e filtração em gel numa coluna de Superose 6 de 100 cm como descrito acima. A Tabela VI mostra uma purificação típica de um lote de 20 mg de α -Gal A recombinante e as actividades específicas da enzima em cada etapa de purificação. A enzima recombinante era essencialmente homogénea, após o passo de filtração em gel, e era >98% pura como avaliado por SDS-PAGE (FIG. 5). Um contaminante menor de albumina sérica bovina foi removido através de um passo adicional de filtração em gel numa coluna de Blue-Sepharose

(Travis, *et al.*, 1976, Biochem. J. 157: 301) resultando uma preparação de enzima que era mais de 99% pura como avaliado por uma carga de 20 µg de α-Gal A em SDS-PAGE.

TABELA VI

Purificação por FPLC de α-Gal A Recombinante				
Uma Operação Típica de Purificação Partindo de 20 mg de α-Gal A				
Passo	U x 10 ³	U x 10 ³	Veze de Purificação	Rendimento%
Média	39,750	5	1	100
α-CalNH ₂ -Sephrose	36,500	680	136	91
Octil-Sephrose	31,750	3,400	680	79
Superose 6	30,800	4,150	830	78

Que a purificação de α-Gal A recombinante seria facilitada por crescimento das células CHO em meio isento de soro foi demonstrado por marcação metabólica de proteína segregada e celular total. Em contraste com o resultado observado na FIG. 5, a α-Gal A radioativamente marcada foi essencialmente a única proteína observada no meio da linha altamente expressora, DG5.3 (FIG. 6).

7.2.2. PROPRIEDADES FÍSICO-CINÉTICAS

Verificou-se que a α-Gal A recombinante tinha um peso molecular de subunidade de ~57 Kd com base em SDS-PAGE (FIG. 5). A Km no sentido do substrato artificial 4-MU-α-D-galactopiranosídeo foi de 1,9 mM (FIG. 7A) e o pH óptimo e o ponto isoeléctrico foram 4,6 e 3,7 respectivamente (FIG. 7B e 7C).

De modo a determinar se a enzima recombinante reconhecia e hidrolisava o seu substrato natural, lipossomas contendo o substrato de α-Gal A marcado com fluorescência P-C₁₂STH e apolipoproteína E (para marcação lisossómica) foram incubados com células CHO que sobre-expressam α-Gal A (clone DG5.3). Como mostrado na FIG. 8A-8B, a α-Gal A lisossómica recombinante rapidamente hidrolisou o substrato em P-C₁₂SDH (o di-hexósido). A rápida hidrólise de P-C₁₂STH indica que a α-Gal A recombinante pode reconhecer este análogo do substrato

natural e muito eficientemente hidrolisá-lo. Igualmente, como este substrato é direccionado para o lisossoma, a α -Gal A recombinante associada às células tem que ser correctamente direccionada para esta localização. Estes resultados indicam que a α -Gal A recombinante produzida e segregada por células CHO é essencialmente idêntica à enzima purificada a partir de plasma humano (Tabela VII).

TABELA VII

Comparação de Propriedades da Enzima α -GALACTOSIDASE A
Recombinante Purificada a Partir de Tecido Humano

Propriedade	α -Gal A		
	Baço	Plasma	Recombinante
PM-Subunidade, (KDa)	53	57	57
pH Óptimo	4,5	4,6	4,6
Ponto Isoeléctrico, PI	4,3	3,7	3,7
Km (4-MU- α -D-Gal), mM	2,5	1,9	1,9
Fosforilação (M-6-P)	+	?	+
Hidrólise do Substrato Natural (GL-3)	+	+	+

7.2.3. PROCESSAMENTO E TAXA DE SECREÇÃO DE α -Gal A RECOMBINANTE

Polipéptidos nascentes, que atravessam o retículo endoplasmático, assumem conformações de estrutura secundária simultaneamente com a tradução ou pouco após a sua síntese estar completa (Gething, et al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32: 185). A α -Gal A foi marcada com [³⁵S]-metionina durante três min e depois perseguida com metionina fria durante os tempos indicados. A α -Gal A imunoprecipitada foi visualizada em SDS-PAGE. As amostras foram preparadas sem DTT de modo a manter as pontes de dissulfureto que se possam ter formado durante a perseguição, indicativas de uma conformação de estrutura secundária. Preparou-se um controlo (+DTT) mantendo em ebulição uma alíquota da amostra dos 60 minutos na presença de DTT para destruir as ligações dissulfureto e a estrutura secundária. A 0 min de perseguição (3 min após a marcação) havia já uma alteração na mobilidade desta enzima indicando que ocorrem alterações conformacionais simultaneamente com a tradução ou pouco após a conclusão da síntese (FIG. 9).

A chegada do novo polipéptido à rede de Golgi foi detectada pela aquisição de oligossacáridos resistentes a Endo H (Gething, *et al.*, 1989, *Meth. Cell. Biol.* 32: 185). A α -Gal A radioativamente marcada (pulso de 3 minutos) foi perseguida com metionina não radioativa e imunoprecipitada como acima. Os imunoprecipitados foram então tratados com Endo H e visualizados em SDS-PAGE. Entre os 2 e os 7 min de perseguição, podia ser detectada a primeira forma resistente a Endo H de α -Gal A, indicativa da chegada da enzima recombinante ao Golgi, cerca de 5 a 10 min após a sua síntese (FIG. 10). A maioria da forma sensível a Endo H foi tornado resistente em 60 min de perseguição.

Esta enzima atravessa a rede de Golgi e é segregada a 45 a 60 min de perseguição (FIG. 11). A análise de meios totais, de células marcadas com [³⁵S]-metionina, revelou que >95% da proteína segregada pelas células CHO recombinantes era α -Gal A (FIG. 12).

7.2.4. ANÁLISE DE PORÇÕES HIDRATO DE CARBONO EM α -Gal A RECOMBINANTE

Existem quatro sequências de consenso de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) na subunidade α -Gal prevista pela sequência de ADNc. O quarto local não é provavelmente utilizado pois contém um resíduo de prolina na posição X. A α -Gal A recombinante foi digerida com Endo H, Endo F, Endo D e PNGase F. A digestão com PNGase F causou um desvio de $\sim$ 7 kDa na mobilidade no SDS-PAGE de metade da α -Gal A (FIG. 13). Esta alteração no peso molecular pode ser atribuída à remoção de 3 porções hidrato de carbono ligadas a N. A digestão da enzima recombinante com um *cocktail* de Endo H, Endo F e PNGase F não resultou em qualquer diminuição adicional no peso molecular, indicando que toda a enzima contém três porções hidrato de carbono ligadas a N.

A Endo D, uma glicosidase com uma especificidade estrita para o ramo Man α 1-3 inferior do pentassacárido nuclear de elevado teor de manose (Tarentino, *et al.*, 1989, *Meth. Cell. Biol.* 32: 111), não teve efeito na mobilidade de α -Gal A, indicando que a enzima recombinante não contém este tipo de oligossacárido (FIG. 13). A Endo H e a Endo F juntas resultaram num desvio de 4 kDa indicando que dois dos três

oligossacáridos nesta enzima são do tipo de elevado teor de manose (Varki & Kornfeld, 1980, J. Biol. Chem. 225: 10847).

É interessante que a α -Gal A intracelular era completamente sensível a PNGase F enquanto metade da enzima segregada era parcialmente resistente a PNGase F (FIG. 14). Como esta resistência foi eliminada pelo co-tratamento com Endo H e Endo F (FIG. 13), são necessários mais estudos com Endo H e Endo F separadamente para determinar a natureza molecular quer da inibição selectiva de PNGase F quer da resistência de uma proporção da enzima segregada recombinante a digestão com PNGase F.

Tendo-se determinado que a enzima recombinante contém três oligossacáridos, dois dos quais do tipo de elevado teor de manose, foi investigado o efeito de inibição de glicosilação (Furhmann, et al., 1985, Biochim. Biophys. Acta 825: 95). O processamento e a secreção de α -Gal A recombinante não são afectados por inibição selectiva de processamento de oligossacáridos. Na presença de desoxinojirimicina (um inibidor de glucosidase I e II), desoximanojirimicina (um inibidor de manosidase I), e swainsonina (um inibidor de manosidase II) a taxa de secreção de α -Gal A permanece a mesma que os controlos (FIG. 15). Contudo, a tunicamicina (um inibidor de adição de oligossacáridos) inibe a secreção de α -Gal A até 80% (FIG. 15). A enzima segregada das culturas tratadas com tunicamicina podia ligar-se a uma coluna de Con A-Sepharose indicando que esta enzima está parcialmente glicosilada, provavelmente devido a inibição incompleta da glicosilação pela tunicamicina. Estes resultados indicam que a adição de oligossacáridos, mas não os eventos de processamento testados, é necessária para a maturação e secreção da enzima recombinante.

7.2.5. FOSFORILAÇÃO

Como a α -Gal A recombinante continha porções de elevado teor de manose, a enzima recombinante podia conter M-6-P e ser competente para assimilação mediada por receptores. As células do clone DG5.3 foram marcadas metabolicamente com [^{31} P]-ortofosfato durante 12 horas e depois os extractos celulares e os meios foram imunoprecipitados e visualizados em SDS-PAGE. Como mostrado na FIG. 16, tanto a α -Gal A associada a células

como a segregada eram fosforiladas, presumivelmente nas suas porções hidrato de carbono como sugerido pelas experiências *in vitro* descritas acima.

7.2.6. ANÁLISE DE OLIGOSSACÁRIDOS SENSÍVEIS A ENDO H

Os oligossacáridos de elevado teor de manose foram removidos por tratamento com Endo H da α -Gal A marcada com [³H]-manose imunoprecipitada. Estes oligossacáridos foram analisados por cromatografia em QAE Sephadex (Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808; e, Varki & Kornfeld, 1980, J. Biol. Chem. 255: 10847). Foram detectadas duas formas principais destes oligossacáridos, uma forma com 2 cargas negativas e uma com 4 cargas negativas (FIG. 17A). A carga negativa pode ser contribuição de uma porção fosfodiéster (-1), uma porção fosfomonoéster (-2) ou ácido siálico (-1). O tratamento destes açúcares com HCl diluído não desvia o perfil de qualquer dos picos indicando que não existem grupos fosfodiéster nestes açúcares (FIG. 17B) (Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808). O tratamento com neuraminidase provoca um desvio do pico -2 resultando dois novos picos a cargas negativas 0 e -1 (FIG. 17C). Portanto, a alteração do pico -2 é contribuição do ácido siálico, muito provavelmente duas porções. O pico -1 resultante após o tratamento com neuraminidase é provavelmente uma digestão parcial do pico -2 pela enzima. O tratamento destes oligossacáridos com fosfatase alcalina provocou um desvio do pico -4 para carga negativa 0 (FIG. 17D). Não houve efeito sobre o pico -2, indicando que a carga do pico -4 é contribuição de duas ligações fosfomonoéster enquanto o pico -2 não contém nenhuma destas ligações. Assim, é evidente destes resultados que a Endo H liberta dois tipos de oligossacáridos de elevado teor em manose a partir da α -Gal A recombinante, um contendo ácido siálico (possivelmente um oligossacárido híbrido) e o outro contendo 2 ligações fosfomonoéster (presumivelmente na forma de manose-6-fosfato).

Para adicionalmente confirmar estas verificações cromatografaram-se os picos -2 e -4 numa coluna de receptor de manose-6-fosfato imobilizado (FIG. 18). Embora o pico -4 interactuasse fracamente com o receptor, podia estar ligado à coluna e necessitava da adição de manose-6-fosfato para eluição. Observou-se uma interacção muito fraca entre a coluna

de receptor e o pico -2, sugerindo que uma porção destes oligossacáridos híbridos pode conter M-6-P.

A interação fraca dos oligossacáridos de elevado teor de manose com o receptor de M-6-P pode ser explicada pela ausência da proteína nuclear (Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808). As células DG5.3 foram marcadas com [³⁵S]-metionina e as secreções foram cromatografadas numa coluna de receptor de manose-6-fosfato imobilizado. Notavelmente, a enzima recombinante ligada fortemente à coluna foi eluída especificamente pela adição de 5 mM M-6-P (FIG. 19).

7.2.7. INTERACÇÃO DE α -Gal A COM O RECEPTOR DE MANOSE-6-FOSFATO

Como se mostrou que a α -Gal A recombinante contém porções manose-6-fosfato, era importante estabelecer se isto era também verdadeiro para a α -Gal A humana normal. Marcaram-se as proteínas de CHO com [³⁵S]-metionina na presença de NH₄Cl, para provocar a secreção quantitativa de enzimas lisossômicas sintetizadas de novo (Dean, et al., 1984, Biochem. J. 217: 27). Recolheu-se o meio e cromatografou-se numa coluna de receptor de manose-6-fosfato imobilizado. Eluiu-se a coluna com um gradiente de manose-6-fosfato como descrito acima. Este protocolo de eluição pode separar enzimas lisossômicas em ligandos de ligação ao receptor de baixa e alta afinidade (Dong & Sahagian, 1990, J. Biol. Chem. 265: 4210).

A enzima recombinante co-eluiu com a globalidade das enzimas lisossômicas a uma concentração de M-6-P indicativa de formas de alta afinidade (FIG. 20A). Realizou-se a mesma experiência com secreções de células MS914 (fibroblastos humanos diplóides normais) (FIG. 20B) e células 293 (células de rim embrionário transformadas com adenovírus humano) (FIG. 20C). Quando se aplicou o mesmo gradiente de M-6-P, a α -Gal A humana também co-eluiu com a globalidade das enzimas lisossômicas, demonstrando que a enzima recombinante exhibe afinidade para com o receptor de M-6-P similar à da enzima humana normal.

7.2.8. ASSIMILAÇÃO MEDIADA POR RECEPTORES DE α -Gal A RECOMBINANTE EM FIBROBLASTOS DE FABRY

Incubaram-se fibroblastos de Fabry com várias quantidades da enzima recombinante durante 6 horas (FIG. 21). A assimilação da enzima era saturável e foi especificamente inibida pela adição de M-6-P 2 mM no meio de assimilação, indicando que a assimilação era por via do receptor de M-6-P da superfície celular.

8. EXEMPLO COMPARATIVO: FUSÃO α -Gal A-PROTEÍNA A EXPRESSA EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

As subsecções adiante descrevem uma construção de fusão do ADNc de α -Galactosidase A humana e do domínio E de ligação a IgG da proteína A de estafilococos expressa em células COS-1 e purificada até à homogeneidade aparente por cromatografia de afinidade com IgG. A construção de fusão foi manipulada utilizando técnicas de PCR para inserir a sequência de reconhecimento de clivagem por collagenase de 16 nucleótidos entre a α -Gal A e a sequência do domínio E da proteína A. Em adição, foi eliminado o codão de terminação do ADNc de α -Gal e inserido no terminal da sequência do domínio E. A expressão transiente da construção de fusão em células COS-1 resultou num aumento de 6 a 7 vezes relativamente aos níveis endógenos de actividade de α -Gal A e secreção significativa no meio (4000 unidades; nmol/hora). A proteína de fusão do meio de cultura foi purificada até à homogeneidade por cromatografia em IgG-Sepharose. Após tratamento com collagenase, a α -Gal A libertada foi separada do péptido de proteína A por cromatografia em IgG. Através deste método mais de 85% da proteína de fusão de α -Gal A segregada foi purificada na forma da proteína homodimérica glicosilada, activa. Este método deverá ser útil para a expressão e rápida purificação de proteínas normais e mutantes. Em adição, esta construção foi inserida nas células CHO DG44 de modo a que possam ser produzidas grandes quantidades da enzima recombinante segregada, e rápida e eficientemente purificadas.

8.1. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1.1. MATERIAIS

As endonucleases de restrição, polimerase Taq, ligase de T4 e os plasmídeos pGem foram obtidos da Promega (Madison, WI). O vector pRIT5 e a IgG-Sepharose foram adquiridos a Pharmacia (Piscataway, NJ). Os kits de sequenciação Sequenase eram da United States Biochemical Corp. (Cleveland, OH). A collagenase foi obtida de Sigma (St. Louis, MO). Os oligonucleótidos foram sintetizados utilizando um sintetizador de ADN da Applied Biosystems, modelo 3808.

8.1.2. CULTURA CELULAR E TRANSFECCÕES

As células COS-1 foram obtidas da ATCC (Rockville, MD). As células foram cultivadas por técnicas padrão em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal de vitelo e antibióticos.

Células COS-1 em crescimento exponencial (5×10^6 células/balão T75) foram destacadas do plástico por tripsinização, recolhidas por centrifugação a $3000 \times g$, e depois lavadas uma vez com tampão de electroporação gelado (sacarose tamponada com fosfato: sacarose 272 mM, fosfato de sódio 7 mM, pH 7,4, contendo $MgCl_2$ 1 mM). Após centrifugação a $3000 \times g$, ressuspenderam-se as células em 0,8 ml de tampão de electroporação e colocaram-se numa cuvete de electroporação com um espaçamento de 0,4 cm. Adicionaram-se dez a quinze μg de AND plasmídico e mantiveram-se as células em gelo durante 5 min. Colocou-se a cuvete contendo as células num aparelho de electroporação Gene Pulser (Bio-Rad) e pulsaram-se as células a 350 V, 25 μF . Mantiveram-se as células em gelo durante mais 10 min e depois colocaram-se numa placa de cultura de 100 mm contendo 10 ml de meio de crescimento.

8.1.3. PCR, SEQUENCIAÇÃO DE ADN E CONSTRUÇÕES DE VECTORES

A construção de fusão foi sintetizada utilizando uma técnica de PCR recentemente descrita (Ho, et al., 1989, Gene 77: 51; Kadowaki, et al., 1989, Gene.76: 161). Resumidamente, o ADNc de α -Gal A de comprimento completo foi subclonado no plasmídeo pGEM e o plasmídeo pG6-AGA resultante foi utilizado

para amplificação por PCR da sequência de α -Gal A com iniciadores desenhados para eliminar o codão de terminação, para adicionar uma sequência de consenso de clivagem por collagenase na extremidade 3' e para incluir uma sequência de reconhecimento de Eco RI na extremidade 5' do ADNc (FIG. 22). O iniciador de sentido directo era 5'-CCGAATTCATGCTGTCCGGTCACCGTG-3' e o iniciador anti-sentido era 5'-CGCCGGACCAGCCGGAAGTAAGTCTTTTAATG-3'. O domínio E da proteína A (Nilsson, *et al.*, 1985, EMBO J. 4: 1075) foi similarmente amplificado com a sequência de consenso da collagenase no oligonucleótido a 5'; os oligonucleótidos de sentido directo e anti-sentido eram 5'-CCGGCTGGTCCGGCGCAACACGATGAAGCT-3' e 5'-GGCCGAATTCCGGGATCCTTATTTTGGAGCTTGAGA-3', respectivamente. Os produtos de 1323 nt e 201 nt das reacções PCR de α -Gal A e proteína A foram purificados em gel num gel de agarose a 0,8% e misturados para a reacção PCR de fusão. O iniciador de sentido directo da reacção de α -Gal A e o iniciador anti-sentido da reacção da proteína A foram utilizados para a reacção de fusão final. O produto desta reacção foi digerido com Eco RI e ligado no plasmídeo pGEM4Z digerido com Eco RI. O domínio E da proteína A e as junções entre o ligante e α -Gal A e proteína A foram confirmados pelo método de sequenciação da terminação de cadeias com didesoxinucleótidos de Sanger (Hanahan & Meselson, 1985, Methods Enzymol. 100: 333). A sequência de fusão confirmada foi então digerida com Eco RI e subclonada no vector de expressão eucariota p91023(B).

8.2. RESULTADOS

8.2.1. CONSTRUÇÃO DA FUSÃO α -Gal A-PROTEÍNA A (AGA-PA)

A FIGURA 22 mostra a estratégia utilizada para a construção da sequência de fusão α -Gal A-domínio E da Proteína A. O ADNc de α -Gal A de comprimento completo (1323 nt) e a sequência do domínio E da proteína A (201 nt) foram amplificados separadamente e depois fundidos através de uma segunda amplificação por PCR (FIG. 22) utilizando o iniciador de sentido directo de ADNc de α -Gal A a 5' (P1) e o iniciador anti-sentido de Proteína A a 3' (P4). Os iniciadores foram desenhados para (a) eliminar o codão de paragem TAA de α -Gal A; (b) inserir a sequência de reconhecimento de consenso de clivagem por collagenase de 16 nt que codifica Pro Ala Gly

Pro entre a sequência de ADNc de α -Gal A e da proteína A; e (c) introduzir um codão de paragem TAA na extremidade 3' do domínio E da proteína A. A integridade desta construção foi confirmada por sequenciação do domínio da proteína A, do ligante e a 3' do ADNc de α -Gal A (FIG. 23).

8.2.2. EXPRESSÃO DE pAGA-PA EM CÉLULAS COS-1

Setenta e duas horas após a transfecção com a construção pAGA-PA, foram detectados níveis máximos de actividade de 4MU α -Gal em extractos celulares e no meio de cultura esgotado (Tabela VIII).

TABELA VIII

Expressão Transiente Da Construção AGA-PA Em Células COS-1.
Após Transfecção Observou-se Um Aumento De 7 Vezes Na
Actividade De α -Gal A Endógena. Igualmente, Observou-se Um
Aumento De α -Gal A No Meio de Cultura

CÉLULAS COS-1	Actividade de α -Gal A*	
	Células	Meio
	(U/mg)	(U/ml)
Controlo	210	0
Transfectadas	1,300	400

*Ensaaiadas utilizando 4MU- α -Gal como substrato.

Comparativamente com a actividade de α -Gal A endógena em células COS-1 de 210 U/mg, as células transfectadas expressaram 1300 U/mg. Não foi detectada actividade de α -Gal A no meio de cultura esgotado de células COS-1 não infectadas enquanto 72 horas após a transfecção, foram segregadas para o meio 400 unidades de actividade.

8.2.3. PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DE α -Gal A

O meio esgotado de uma única placa de 100 mm de células COS-1 foi recolhido 72 horas após a transfecção e aplicado numa coluna de IgG-Sepharose. Uma actividade mínima de α -Gal A passou através da coluna durante a aplicação da amostra (fluxo de passagem), ou durante a lavagem com tampão (Tabela IX). Contudo, mais de 95% da proteína de fusão de α -Gal A ligada

foi eluída pela adição de ácido acético 0,5 M (tampão de eluição).

TABELA IX

Cromatografia em IgG-Sepharose Do Produto De Fusão α -Gal A-Proteína A Do Meio De Cultura De Células COS-1 Transfectadas

Passo de Purificação	Actividade de α -Gal A* (U/ml)
Meio	4400
Fluxo de passagem	10
Tampão de lavagem	0
Eluição**	4200

* Aplicaram-se dez ml de meio de cultura na coluna, lavou-se e eluiu-se como descrito em "Métodos". A actividade de α -Gal A foi ensaiada utilizando 4MU- α -Gal como substrato.

** HAc 0,5 M, pH 3,4

8.2.4. LIBERTAÇÃO DO DOMÍNIO DA PROTEÍNA A DA PROTEÍNA DE FUSÃO AGA-PA

A proteína de fusão purificada por afinidade foi tratada com collagenase durante 1 hora e os produtos da reacção foram re-cromatografados na coluna de afinidade de IgG (Tabela X). O domínio E da Proteína A ligou-se prontamente à coluna de IgG, enquanto a α -Gal A humana eluiu no fluxo de passagem. Foi eluída quase 90% da actividade aplicada. Com base na actividade específica da enzima purificada, estimou-se que este procedimento resultava em enzima 90% pura.

TABELA X

Tratamento Da Fusão α -Gal A-Proteína Com Collagenase. Após Tratamento A Ligação Da Coluna De IgG Diminuiu De 69% Para 11%.

PASSO	% De Actividade De α -Gal A Recuperada*	
	COLAGENASE**	
	-	+
Fluxo de passagem	31	89
Eluição	69	11

* Ensaiada utilizando 4MU- α -Gal como substrato; aplicou-se um total de 4200 unidades de actividade de α -Gal A.

** Tratamento com collagenase durante 1 hora a 25°C.

9. EXEMPLO: MODIFICAÇÃO IN VIVO DA GLICOSILAÇÃO DE α -Gal A HUMANA RECOMBINANTE POR α 2,6-SIALILTRANSFERASE

O exemplo aqui apresentado descreve um método através do qual enzima α -Gal A humana recombinante é produzida numa forma que se assemelha mais proximamente à glicoforma plasmática nativa da enzima. Especificamente, a α -Gal A é produzida em linhas de células CHO que foram manipuladas para conter um gene de α -2,6-sialiltransferase de modo que a proteína α -Gal A produzida nestas linhas celulares é sialilada. Os resultados apresentados adiante demonstram que a enzima α -Gal A biologicamente activa produzida utilizando estas linhas celulares exhibe uma mais ampla distribuição nos tecidos, o que pode melhorar o valor terapêutico desta α -Gal A recombinante.

9.1. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1.1. CONSTRUÇÃO DO VECTOR DE EXPRESSÃO DE α -2,6-SIALILTRANSFERASE, pST26

O ADNc de rato de 1,6 kb (ST3) que codifica a sequência de aminoácidos completa da β -galactósido- α -2,6-sialiltransferase (Gal α 2,6ST; Weinstein *et al*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 17735) foi subclonado no local BamHI do vector de expressão em mamífero pRLDN, uma oferta de Smith, Kline and French Laboratories, resultando o vector designado por pST26. Esta construção foi introduzida por electroporação na linha de células CHO DG5.3-1000Mx, um alto sobre-expressor de α -galactosidase A humana. Seleccionaram-se clones por crescimento em meios contendo 500 μ g/ml de G418 para seleccionar quanto a expressão do gene neo de pST26. Os clones positivos foram isolados individualmente utilizando anéis de clonagem e depois cada um foi analisado quanto a expressão de α -galactosidase A humana recombinante segregada total. Em adição, a percentagem de α -galactosidase A recombinante segregada que continha resíduos de ácido siálico em α -2,6 foi determinada por cromatografia com aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) numa coluna de SNA-Sepharose, como descrito por Lee *et al* (1989, *J. Biol. Chem.* 264: 13848-13855).

9.1.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE SNA-LECTINA

Para a microscopia de fluorescência, cresceram-se os clones positivos de DG5.3-1000Mx-St26 em lamelas de vidro de 12 mm e depois coraram-se com SNA marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) como previamente descrito (Lee *et al*, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 13848-13855). Em resumo, as células foram fixadas com uma solução fresca de *para*-formaldeído a 2%, glutaraldeído a 0,1% em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,0, durante 1 h a 23°C, e subsequentemente bloquearam-se com NH₄Cl 50 mM em PBS durante 30 min a 23°C. Incubaram-se as células com FITC-SNA numa concentração de 25 mg/ml em PBS durante 30 min a 23°C. Após lavagem com PBS, montaram-se as lamelas em 15% de vinol 205 álcool polivinílico, 33% de glicerol, 0,1% de azida de sódio em Tris 100 mM, pH 8,5. Observaram-se as células com um microscópio de fluorescência Zeiss Photomat III e fotografaram-se utilizando filme Kodak Gold a cores, 25 ASA.

9.1.3. PURIFICAÇÃO DE α -GAL A HUMANA RADIOATIVAMENTE MARCADA COM E SEM RESÍDUOS DE ÁCIDO SIÁLICO EM α -2,6

Cresceram-se células DG5.3-1000Mx progenitoras e células modificadas DG5.3-ST26.1 em frascos rolantes de 1 litro (~5 x 10⁸ células) com 125 ml de DMEM, contendo 10% de soro de vitelo fetal dialisado (GIBCO, Grand Island, NY) e [³⁵S]-metionina 500 μ Ci. Substituiu-se o meio radioactivo diariamente durante três dias, e recolheu-se o meio esgotado de cada linha, reuniu-se e concentrou-se utilizando um concentrador de células agitado (Amicon, Bervely, MA). Aproximadamente 2 mg (4 x 10⁶ U) de enzima recombinante segregada pelas linhas de células DG5.3-100Mx e DG5.3-1000Mx-ST26.1, respectivamente, foram purificados individualmente até uma actividade específica de 100 cpm/U de enzima. As preparações de α -galactosidase A recombinante segregada, radioativamente marcada, purificada (0,5 mg cada), foram tratadas individualmente com 5 unidades de fosfatase ácida (Sigma) e as formas desfosforiladas foram também utilizadas para injeções intravenosas.

9.1.4. SEMIVIDA E DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS *IN VIVO* DE α -GAL A RECOMBINANTE

Para as determinações da semivida no plasma, cada forma de α -Gal A radioactivamente marcada foi injectada na veia da cauda de dois ratinhos fêmea CDI. Cada animal foi sangrado através do plexo sinusal em intervalos de tempo determinados ao longo de um período de 10-20 min. Centrifugaram-se as amostras de sangue numa centrífuga IEC Microhematocrit e adicionaram-se 50 μ l de plasma a um fluido de cintilação aquoso (AquaSol, NEN, Boston, MA) para contagem. Para determinar a distribuição nos tecidos das diferentes formas da enzima, sacrificaram-se dois ratinhos para cada enzima por decapitação, 4 h após a injeção da enzima, removeram-se tecidos seleccionados, e determinou-se a radioactividade nos vários tecidos e expressou-se por grama de peso molhado de tecido. Cada valor é a média de duas experiências independentes.

9.2. RESULTADOS

9.2.1. INTRODUÇÃO DE pST26 EM CÉLULAS CHO DG5.3-1000Mx E DEMONSTRAÇÃO DE ACTIVIDADE DE α -2,6-SIALILTRANSFERASE EM CLONES SELECIONADOS COM G418

Após electroporação do plasmídeo pST26 em células CHO DG5.3-1000Mx, seleccionaram-se as células transformadas que eram resistentes ao antibiótico G418. Do conjunto de células resistentes, isolaram-se 10 clones individuais e expandiram-se para estudos posteriores. Designaram-se estes clones por DG5.3-1000Mx-ST26.1 a ST26.10. Como evidência da presença de actividade de α -2,6-sialiltransferase nestas células, corou-se cada linha celular com FITC-SNA e depois examinou-se por microscopia de contraste de fases e de fluorescência. Todas as dez linhas celulares DG5.3-1000Mx-ST26 foram positivamente coradas pela lectina fluorescente, indicando que várias glicoproteínas da membrana celular serviram como aceitadores para a α -2,6-sialiltransferase expressa. Em contraste, a FITC-lectina não corou as células progenitoras DG5.3.-1000Mx.

9.2.2. CARACTERIZAÇÃO DE α -GAL A α -2,6-SIALILADA HUMANA RECOMBINANTE SEGREGADA

Cresceram-se cada uma das dez linhas celulares DG5.3-1000Mx-ST26 e as células progenitoras DG5.3-1000Mx, em placas de 100 mm, com a mesma densidade celular. A quantidade de actividade de α -Gal A humana segregada por mg de proteína das células totais cultivadas, foi determinada para cada linha celular. As linhas DG5.3-1000Mx-ST26 segregaram de 28 a 100% da α -Gal A segregada pela linha celular progenitora (16 000 U/mg de proteína, Tabela XI).

Para determinar a percentagem da α -Gal A humana recombinante segregada que continha resíduos de ácido siálico em α -2,6, cromatografou-se a enzima segregada numa coluna com SNA imobilizada, e eluiu-se a enzima ligada com lactose 0,4 M. Tal como mostrado na Tabela XI, os clones individuais tinham 55 a 100% da actividade enzimática aplicada que foi especificamente ligada e eluiu da coluna de lectina. De forma notável, o clone DG5.3-1000Mx-ST26.1 produziu a maior quantidade de α -Gal A recombinante, essencialmente toda a forma da enzima estava sialilada e ligada à coluna com SNA imobilizada. Em contraste, a α -Gal A recombinante segregada pelas células progenitoras DG5.3-1000Mx apresentou pouca, se alguma, ligação a lectina específica para o ácido siálico em α -2,6 (Tabela XI).

TABELA XI

Linhas de células CHO DG5.3-1000Mx-ST26 que segregam α -Galatosidase A α -2,6-sialilada humana

Clone/ Subclone	Percentagem de α -Gal A segregada ligada a SNA-Lectina	Secreção de α -Gal A (% de DG5.3-1000Mx*)
DG5.3-1000MX	5	100
Subclones DG5.3-1000Mx-ST26:		
1	100	100
2	99	76
3	93	72
4	79	70
5	74	64
6	73	85
7	72	85
8	55	84
9	51	81
10	28	79

* A actividade é expressa em unidades por mg de proteína celular; A linha DG5.3-1000Mx segregou ~16 000 U/mg.

9.2.3. SEMIVIDA NO PLASMA E DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS DE α -GAL A HUMANA α -2,6-SIALILADA EM RATINHOS

Para determinar se a depuração *in vivo* de α -Gal A humana recombinante α -2,6-sialilada era diferente da da enzima não α -2,6-sialilada, injectaram-se ratinhos com cada uma das formas e determinaram-se as suas semividas em circulação. Tal como se mostra na Figura 24A, a presença de porções ácido siálico em α -2,6 aumentou a semivida da enzima na circulação de 14 para quase 30 min. Adicionalmente, o tratamento das enzimas recombinantes α -2,6-sialilada e não α -2,6-sialilada com fosfatase ácida aumentou a semivida no plasma *in vivo* da enzima não α -2,6-sialilada ($T_{1/2}$ de 14 para 24 min), enquanto a da enzima α -2,6-sialilada tratada com fosfatase permaneceu igual em cerca de 28 min. (FIG. 24B).

Tal como representado na Figura 25, a presença ou ausência de porções ácido siálico em α -2,6 e/ou resíduos

fosfato, nas formas de α -Gal A humana recombinante segregada teve um efeito marcado sobre as suas respectivas distribuições nos tecidos após administração intravenosa a ratinhos. A maior percentagem de α -Gal A α -2,6-sialilada total injectada, foi recuperada nos pulmões, rins e coração, em comparação com a enzima não α -2,6-sialilada; em contraste, foi recuperada menos enzima α -2,6-sialilada no baço. Foi interessante que, quando a enzima α -2,6-sialilada foi tratada com fosfatase ácida, a enzima modificada foi redistribuída ao fígado e baço, presumivelmente às suas células reticuloendoteliais (FIG. 25). O tratamento com fosfatase ácida da enzima não α -2,6-sialilada resultou na recuperação de significativamente mais enzima do que a sua forma não tratada com fosfatase, nos pulmões e coração, enquanto foi recuperada menos no rim (FIG. 25).

10. EXEMPLO COMPARATIVO: A SOBRE-EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LISOSSÓMICAS HUMANAS RESULTA NA SUA AGREGAÇÃO INTRACELULAR, CRISTALIZAÇÃO EM LISOSSOMAS E SECREÇÃO SELECTIVA

O exemplo aqui apresentado descreve um método, que é uma característica inerente da invenção e foi primeiro notado quando se sobre-expressava α -Gal A, pelo qual determinadas proteínas que são normalmente direccionadas intracelularmente podem ser recombinantemente expressas numa forma segregada. Utilizando várias enzimas lisossómicas recombinantes, os resultados demonstram que a sobre-expressão destas proteínas em células CHO presumivelmente conduz a agregação que, por sua vez, faz com que a proteína seja segregada, em vez de ser direccionada para as vesículas intracelulares, neste caso lisossomas, para as quais seriam normalmente enviadas. Esta surpreendente característica de secreção facilita a purificação da proteína recombinante produzida.

10.1. MATERIAIS E MÉTODOS

10.1.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA SOBRE-PRODUÇÃO DE ENZIMAS LISOSSÓMICAS

A construção da construção de expressão de α -Gal A, p91-AGA, foi descrita *supra* (Secção 6.1.2). As construções de expressão análogas para a α -N-acetilgalactosaminidase humana

(designada p91-AGB) e esfingomielinase ácida (designada p91-ASM) e a expressão transiente respectiva de cada uma em células COS-1 foram descritas (Wang *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265: 21859-21866; Schuchman *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266: 8535-8539).

10.1.2. CULTURA CELULAR, ELECTROTRANSFECCÃO E AMPLIFICAÇÃO DE GENES

Cresceram-se as células CHO e mantiveram-se como descrito *supra*, na Secção 6.1.3. Do mesmo modo, realizou-se a electroporação como descrito *supra*, na Secção 6.1.3.

Realizou-se a estimulação com butirato das células CHO que expressam α -Gal A como previamente descrito (Dorner *et al.*, 1989 J. Biol. Chem. 264:20602-20607). Resumidamente, plaquearam-se as células em placas de 100 mm e deixaram-se crescer em 10 ml de DMEM suplementado com 10% de dFCS durante 2 dias. Removeram-se os meios e substituíram-se por 10 ml de DMEM suplementado com 10% de dFCS contendo butirato de sódio 5 mM. Incubaram-se as células durante 16 h a 37°C numa incubadora com CO₂ e depois colheram-se as células e os meios de cultura e determinou-se a actividade de α -Gal A.

10.1.3. ESTUDOS ULTRA-ESTRUTURAIS E DE IMUNOMARCAÇÃO

Cresceram-se células DG5.3-1000Mx até à confluência em placas de 100 mm. Após tripsinização (tripsina a 0,25%, EDTA), lavaram-se duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e sedimentaram-se a 1500 g durante 5 min à temperatura ambiente. As células foram então fixadas durante 1 h com glutaraldeído a 3% em PBS, seguida de fixação em OsO₄ a 1% tamponado com PBS durante 30 min à temperatura ambiente. Desidrataram-se então amostras com passos graduados de etanol, infiltraram-se com óxido de propileno e embeberam-se em Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Cortara-se secções de 1 μ m das áreas representativas. Prepararam-se secções ultrafinas e coraram-se com acetato de urânio e citrato de chumbo, e depois visualizaram-se com um microscópio electrónico (JEM 100 CX, Jeol. USA, Peabody, MA).

Para a imunodeteção, prepararam-se secções preparadas como acima, e após embebição, montaram-se em grelhas de níquel revestidas de Formvar (Formvar Scientific, Marietta, OH), incubaram-se com soro de cabra em PBS durante 30 min a 37°C para bloquear a ligação não específica, lavaram-se seis vezes com PBS e depois incubaram-se com anticorpos anti- α -Gal A de coelho purificados por afinidade durante 1 h. Lavaram-se as secções extensivamente como acima e depois incubaram-se com partículas de ouro de 10 nm conjugadas com proteína A (Amersham Corp., Arlington, IL) durante 1 h a 37°C. Após lavagem com PBS, fixaram-se as secções com glutaraldeído a 3% em PBS durante 15 min à temperatura ambiente, lavaram-se novamente com PBS e depois examinaram-se ao microscópio electrónico.

10.1.4. SDS-PAGE E AUTORADIOGRAFIA

Realizou-se a electroforese em gel PAGE sob condições redutoras como descrito por Laemmli (1970 *Nature* (London) 277:680-685) em blocos de gel de 1,5 mm de espessura contendo 10% de acrilamida. Fixou-se o gel em ácido acético a 10% e metanol a 20% durante 30 min e depois mergulhou-se em Amplify (Amersham Corp.) durante 30 min com agitação. Secaram-se os géis sob vácuo durante 90 min (Hoffer Scientific Instruments, San Francisco, CA) e depois autorradiografaram-se com filme Kodak X Omat AR (Eastman Kodak Co.) durante 4-24 h.

10.1.5. ESTUDOS *IN VITRO* DE AGREGAÇÃO DE α -GAL A

Investigou-se a possível formação de agregados insolúveis de α -Gal A a várias concentrações de enzima e de hidrogenião. Utilizando uma solução de reserva de α -Gal A segregada purificada (16 mg/ml em tampão Tris 10 mM, pH 7,0), colocaram-se alíquotas apropriadas em tubos de vidro de borossilicato e levaram-se os volumes a 200 μ l com água destilada de modo a que com a adição de 100 μ l do tampão apropriado (ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico 0,5 M, a pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ou 7,0), fossem alcançadas as concentrações finais α -Gal A (0,1-10 mg/ml) a valores específicos de pH. Após incubação durante 10 min à temperatura ambiente, determinou-se a turbidez de cada solução medindo a DO a 650 nm num espectrofotómetro (Spectronic 1201, Milton Roy

Co., Rochester, NY) utilizando uma cuvete de 1 cm de percurso. Como controlo, misturou-se 1 mg/ml de α -Gal A segregada, purificada, com concentrações crescentes de BSA (0,1-10 mg/ml) e determinou-se a turbidez de cada solução. Realizaram-se experiências similares com soluções de α -Gal A (10 mg/ml) e BSA (2 mg/ml), a pH decrescente (de pH 7,0 a 5,0). Após incubação e centrifugação como acima, submeteram-se os sobrenadantes e as peletes a SDS-PAGE.

10.1.6. ENSAIOS À ENZIMA E À PROTEÍNA

As actividades de α -Gal A nos lisados celulares e nos meios foram determinadas utilizando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (4MU- α -Gal) 5 mM (Genzyme Corp., Cambridge, MA) como anteriormente descrito (Bishop e Desnick, 1981 J. Biol. Chem. 256:1307-1316). Resumidamente, preparou-se uma solução de reserva de 4MU- α -Gal 5 mM em tampão de citrato 0,1 M/fosfato 0,2 M, pH 4,6, num banho ultra-sónico. A mistura reaccional, contendo 10 - 50 μ l de extracto celular e 150 μ l da solução de reserva de substrato, foi incubada a 37°C durante 10 a 30 min. Terminou-se a reacção com a adição de 2,3 ml de etilenodiamina 0,1 M. Determinou-se a fluorescência utilizando um fluorómetro Ratio-2 System Fluorometer (Optical Technology Devices, Elmsford, NY). 1U de actividade é a quantidade de enzima que hidrolisa uma nmol de substrato por hora. As actividades de α -manosidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase, β -glucuronidase, fosfatase ácida e α -N-acetilgalactosaminidase foram medidas utilizando o substrato de 4-metilumbelliferilo apropriado. A actividade de esfingomielinase ácida foi determinada de acordo com Gal et al. (1975, N. Eng. J. Med. 293:632-636). Quantificaram-se as concentrações de proteína pelo método da fluorescamina (Bohlen et al., 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155:213-220) como modificado por Bishop et al. (1978, Biochem. Biophys. Acta 524:109-120).

10.2. RESULTADOS

10.2.1. RESULTADOS DA SOBRE-EXPRESSÃO EM ESTRUTURAS CRISTALINAS CONTENDO α -GAL A HUMANA EM VESÍCULAS LIMITADAS POR MEMBRANAS

O exame ultra-estrutural das células DG5.3-1000Mx estavelmente amplificadas revelou numerosos corpos cristalinos de 0,25 a 1,5 μ m que tinham redes ordenadas triangulares em vesículas limitadas por membranas em todo o citoplasma (FIG. 26A e 26B), que a repetição no interior destas estruturas cristalinas era de cerca de 20 nm, que estas estruturas eram particularmente abundantes em lisossomas (FIG. 28A) e em vesículas que pareciam ser TGN dilatado (FIG. 28B) (Hand e Oliver, 1984, *J. Histochem. Cytochem.* 42: 403-442; Griffith e Simons, 1986, *Science* 234:438-443; McCracken, 1991, em *Intracellular Trafficking of Proteins*, Steer e Hanover, eds., Cambridge University Press, New York pp. 461-485). É de notar que não foram observadas estruturas de Golgi normais nestas células, enquanto complexos de Golgi eram prontamente identificados nas células DG44 progenitoras (FIG. 26E, inserto). Quando secções fixadas com ósmio-glutaraldeído das células DG5.3-1000Mx eram incubadas com anticorpos de coelho anti- α -Gal A humana purificados por afinidade e depois com ouro conjugado com proteína A, estas estruturas cristalinas eram especificamente coradas por partículas de ouro (FIG. 26C e 26D). O facto das estruturas cristalinas serem marcadas com imuno-ouro, mesmo estando as secções fixadas em ósmio-glutaraldeído, sugeriu que estas estruturas eram principalmente, se não unicamente, compostas por enzimas humanas.

Para determinar se as estruturas cristalinas estavam presentes em clones que expressam menores níveis de α -Gal A, cresceram-se clones DG5.3-0Mx, -1.3Mx, -250Mx e -1000Mx até à confluência e examinaram-se por microscopia electrónica. Embora o TGN fosse cada vez mais dilatado com o aumento da expressão de α -Gal A, apenas o clone DG5.3-1000Mx continha arranjos cristalinos em lisossomas. Similarmente, o clone DG5.3-1.3Mx foi estimulado com butirato de sódio 5mM durante 18 h para aumentar a transcrição do vector integrado contendo o ADNc de α -Gal A e depois examinado ultra-estruturalmente.

Comparativamente com o clone não tratado, o tratamento com butirato resultou na presença de organelos dilatados incluindo muitas estruturas ligadas à membrana contendo material denso. Estes resultados indicaram que a formação de cristais era dependente da concentração de α -Gal A. Adicionalmente, para avaliar se a formação de cristais era específica para α -Gal A, examinou-se o clone AGB14.8-1000Mx, que sobre-expressa α -N-Acetilgalactosaminidase. Não se observaram quaisquer arranjos cristalinos, mas eram observadas numerosas estruturas dilatadas similares às do clone DG5.3-1.3Mx, sugerindo que a expressão da α -N-acetilgalactosaminidase recombinante não tinha atingido o nível crítico necessário para a formação de cristais.

10.2.2. AGREGADOS DE α -GAL A E α -N-ACETILGALACTOSAMINIDASE A CONCENTRAÇÃO ELEVADA E BAIXO pH

Como era concebível que a sobre-expressão de α -Gal A resultasse na formação de agregados solúveis e particulados que não se ligavam ou eram ineficientemente ligados pela M6PR e/ou a sulfotransferase no TGN, a possível agregação de α -Gal A foi avaliada *in vitro* para várias concentrações de enzima e de hidrogenião. Como mostrado na FIG. 27A, a quantidade de α -Gal A precipitou, comparativamente com cerca de 30% ($>2 \times 10^6$ U) a pH 5,0. A pH 6,0, o pH estimado do TGN (Griffith e Simons, 1986, Science 234: 438-443), cerca de 12% da enzima formou agregados particulados que podiam ser sedimentados por centrifugação a 15 000 x g. A FIG. 27B mostra que a turbidez, como medida da agregação (Halper e Stere, 1977, Arch. Biochem. Biophys. 184: 529-534), de soluções contendo 0,1 a 10 mg/ml de α -Gal A quer a pH 5,0 ou 7,0 aumentava em função da concentração de enzima. Adicionalmente, a turbidez de uma solução de α -Gal A a 1 mg/ml foi essencialmente não foi afectada pela presença de concentrações crescente de albumina de 0,1 a 10 mg/ml a pH 5,0 (FIG. 27B; controlo). Finalmente, a electroforese do sobrenadante e fracções de peletes de soluções contendo α -Gal A (10 mg/ml) e albumina sérica bovina (BSA) (2 mg/ml) incubadas a várias concentrações de hidrogenião revelou que a crescente precipitação de α -Gal A com a diminuição do pH era específica da enzima, pois a BSA não precipitou para além desta gama de pH (FIG. 27C).

10.3. DISCUSSÃO

É proposto um modelo de "agregação-secreção" para explicar o redireccionamento de α -Gal A humana como protótipo para proteínas direccionadas sobre-produzidas. Como representado na FIG. 28, a enzima sobre-produzida é normalmente sintetizada e processada até atingir a rede *trans*-Golgi (TGN). Nesta estrutura, a enzima sobre-produzida é acumulada e sujeita a um ambiente marcadamente mais ácido, (pH ap. 6,0), que conduz a interacções aumentadas proteína-proteína que geram agregados solúveis e particulados de α -Gal A. Em resultado desta agregação, as porções M6P das enzimas ficam inacessíveis ou menos acessíveis para ligação ao MGPR. Os agregados com porções MGP inacessíveis, por defeito, são redireccionados através da via secretória constitutiva (Helms et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 20,027-20,032).

A resposta celular, portanto, à sobre-produção de proteína direccionada ao lisossoma é o transporte das proteínas possuindo resíduos MGP disponíveis para o lisossoma e o redireccionamento da maioria das proteínas sobre-produzidas, e presumivelmente agregadas, através da via de secreção constitutiva. O facto de grandes quantidades de α -Gal A recombinante humana serem segregadas por células CHO permite o aumento de escala da produção e a fácil purificação da enzima recombinante para cristalografia e para ensaios de terapia de substituição enzimática em pacientes com doença de Fabry. Em adição, é evidente que a série de amplificação de células CHO que sobre-expressam α -Gal A proporciona um sistema experimental de mamífero único para caracterizar eficientemente a biossíntese, modificações pós-tradução e mecanismos responsáveis pelo direccionamento lisossómico e secreção selectiva deste protótipo de enzima lisossómica, desse modo proporcionando esclarecimentos adicionais sobre a natureza do transporte e classificação de proteínas em células de mamífero.

Assim, a sobre-expressão de proteínas lisossómicas e talvez de outras proteínas direccionadas em células CHO proporciona um método conveniente para a produção de grandes quantidades da proteína para análises estruturais e/ou

aplicações terapêuticas, assim como proporciona uma útil abordagem ao estudo da biossíntese e classificação de proteínas.

11. DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

As seguintes estirpes de *E. coli* portadoras dos plasmídeos enumerados foram depositadas na *Agricultural Research Collection (NRRL)*, Peoria, IL, e foram-lhes atribuídos os seguintes números de acesso:

<u>Célula hospedeira</u>	<u>Estirpe</u>	<u>Plasmídeo</u>	<u>Nº. de acesso</u>
<i>E. coli</i>	k12	p91.AGA	B 18722
<i>E. coli</i>	k12	pAGA-PA	B 18723

A presente invenção não se encontra limitada no seu âmbito aos microorganismos depositados pois as concretizações depositadas destinam-se à ilustração de aspectos individuais da invenção e quaisquer microorganismos, ou construções que sejam funcionalmente equivalentes, estão dentro do âmbito da presente invenção. De facto serão evidentes para os peritos na especialidade várias modificações da invenção em adição às que foram aqui apresentadas e descritas, a partir da descrição anterior e desenhos anexos. Estas modificações pretendem-se dentro do âmbito das reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Desnick, Robert J.
Bishop, David F.
Ioannou, Yiannis A.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Clonagem e Expressão de alfa-Galactosidase A Biologicamente Activa

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 13

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: PENNIE & EDMONDS
(B) RUA: 1155 Avenue of the Americas
(C) CIDADE: New York
(D) ESTADO: New York
(E) PAÍS: E.U.A.
(F) CÓDIGO POSTAL: 10036

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: disquete
- (B) COMPUTADOR: compatível com PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, versão #1.25

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: US 07/983,451
- (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 30-NOV-1992
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:

- (A) NOME: Coruzzi, Laura A.
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 07/983,451
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: 6923-030

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÃO:

- (A) TELEFONE: 212-790-9090
- (B) TELEFAX: 212-869-8864/9741
- (C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 1393 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 61..1350

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

AGGTTAATCT TAAAGCCCA GGTTACCGC GGAAATTAT CCTGTCGGT CACCGTGACA	60
ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA CTA CAT CTG GGC TGC GCG CTT GCG CTT	108
Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu	
1 5 10 15	

CGC TTC CTG GCC CTC GTT TCC TGG GAC ATC CCT GGG GCT AGA GCA CTG Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu 20 25 30	156
GAC AAT CGA TTG GCA AGG ACG CCT ACC ATG GGC TGG CTG CAC TGG CAG Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu 35 40 45	204
CGC TTC ATG TGC AAC CTT GAC TGC CAG GAA GAG CCA GAT TCC TGC ATC Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile 50 55 60	252
AGT GAG AAG CTC TTC ATG GAG ATG GCA GAG CTC ATG GTC TCA GAA GGC Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly 65 70 75 80	300
TGG AAG GAT GCA GGT TAT GAG TAC CTC TGC ATT GAT GAC TGT TGG ATC Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met 85 90 95	348
GCT CCC CAA AGA GAT TCA GAA GGC AGA CTT CAG GCA GAC CCT CAG CGC Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg 100 105 110	396
TTT CCT CAT GGG ATT CGC CAG CTA GCT AAT TAT GTT CAC AGC AAA GGA Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly 115 120 125	444
CTG AAG CTA GGG ATT TAT GCA GAT GTT GGA AAT AAA ACC TGC GCA GGC Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly 130 135 140	492
TTC CCT GGG AGT TTT GGA TAC TAC GAC ATT GAT GCC CAG ACC TTT GCT Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala 145 150 155 160	540
GAC TGG GGA GTA GAT CTG CTA AAA TTT GAT GGT TGT TAC TGT GAC AGT Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser 165 170 175	588
TTG GAA AAT TTG GCA GAT GGT TAT AAG CAC ATG TCC TTG GCC CTG AAT Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn 180 185 190	636
AGG ACT GGC AGA AGC ATT GTC TAC TCC TGT GAG TGG CCT CTT TAT ATC Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met 195 200 205	684
TGG CCC TTT CAA AAG CCC AAT TAT ACA GAA ATC CGA CAG TAC TGC AAT Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn 210 215 220	732
CAC TGG CGA AAT TTT GCT GAC ATT GAT GAT TCC TGG AAA AGT ATA AAG His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys 225 230 235 240	780
AGT ATC TTG GAC TGG ACA TCT TTT AAC CAG GAG AGA ATT GTT GAT GTT Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val 245 250 255	828
CCT GGA CCA GGG GGT TGG AAT GAC CCA GAT ATG TTA GTC ATT GGC AAC Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn 260 265 270	876
TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG CAA GTA ACT CAG ATG GCC CTC TGG GCT Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala 275 280 285	924

ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC ATG TCT AAT GAC CTC CGA CAC ATC AGC Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser 290 295 300	972
CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT CAG GAT AAG GAC GTA ATT GCC ATC AAT Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn 305 310 315 320	1020
CAG GAC CCC TTG GGC AAG CAA GGG TAC CAG CTT AGA CAG GGA GAC AAC Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn 325 330 335	1068
TTT GAA GTG TGG GAA CGA CCT CTC TCA GGC TTA GCC TGG GCT GTA GCT Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala 340 345 350	1116
ATG ATA AAC CGG CAG GAG ATT GGT GGA CCT CGC TCT TAT ACC ATC GCA Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala 355 360 365	1164
GTT GCT TCC CTG GGT AAA GGA GTG GCC TGT AAT CCT GCC TGC TTC ATC Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile 370 375 380	1212
ACA CAG CTC CTC CCT GTG AAA AGG AAG CTA GGG TTC TAT GAA TGG ACT Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr 385 390 395 400	1260
TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGC ACT GTT TTG CTT CAG Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln 405 410 415	1308
CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT TAAAAA Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu 420 425 430	1357
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1393

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 429 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TOPOLOGIA: linear

(ii) MOLÉCULA TIPO: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu 1 5 10 15
Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu 20 25 30
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu 35 40 45
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile 50 55 60
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly 65 70 75 80
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met 85 90 95

```

Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
100                               105                               110

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
115                               120                               125

Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
130                               135                               140

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
145                               150                               155                               160

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
165                               170                               175

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
180                               185                               190

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
195                               200                               205

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
210                               215                               220

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
225                               230                               235                               240

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
245                               250                               255

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
260                               265                               270

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
275                               280                               285

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
290                               295                               300

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305                               310                               315                               320

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
325                               330                               335

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
340                               345                               350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
355                               360                               365

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
370                               375                               380

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385                               390                               395                               400

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Glr
405                               410                               415

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
420                               425

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 411 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
1 5 10 15
Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
20 25 30
Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn
35 40 45
Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln
50 55 60
Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys
65 70 75 80
Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys
85 90 95
Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu
100 105 110
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met
115 120 125
Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr
130 135 140
Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser
145 150 155 160
Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu
165 170 175
Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr
180 185 190
Glu Gly Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile
195 200 205
Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser
210 215 220
Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln
225 230 235 240
Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
245 250 255
Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Arg Ser Arg Ala Gln Met Ala
260 265 270
Leu Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg
275 280 285
Thr Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile
290 295 300

Lys Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Ile His Lys Glu
305 310 315 320
Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
325 330 335
Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
340 345 350
Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
355 360 365
Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
370 375 380
Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
385 390 395 400
Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
405 410

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 404 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

```

Met Phe Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Cys Ile Ser Leu Lys Gly Val
 1      5      10      15
Phe Gly Ser Tyr Asn Gly Leu Gly Leu Thr Pro Gln Met Gly Trp Asp
 20      25      30
Asn Trp Asn Thr Phe Ala Cys Asp Val Ser Glu Gln Leu Leu Leu Asp
 35      40      45
Thr Ala Asp Arg Ile Ser Asp Leu Gly Leu Lys Asp Met Gly Tyr Lys
 50      55      60
Tyr Ile Ile Leu Asp Asp Cys Trp Ser Ser Gly Arg Asp Ser Asp Gly
 65      70      75      80
Phe Leu Val Ala Asp Glu Gln Lys Phe Pro Asn Gly Met Gly His Val
 85      90      95
Ala Asp His Leu His Asn Asn Ser Phe Leu Phe Gly Met Tyr Ser Ser
 100     105     110
Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Ala Gly Tyr Pro Gly Ser Leu Gly Arg Glu
 115     120     125
Glu Glu Asp Ala Gln Phe Phe Ala Asn Asn Arg Val Asp Tyr Leu Lys
 130     135     140
Tyr Asp Asn Cys Tyr Asn Lys Gly Gln Phe Gly Thr Pro Glu Ser Tyr
 145     150     155     160
Arg Lys Met Ser Asp Ala Leu Asn Lys Thr Gly Arg Pro Ile Phe Tyr
 165     170     175

```

Ser Cys Asn Trp Gly Leu Tyr Gly Ser Gly Ile Ala Asn Ser Trp Arg
 180 185 190
 Met Ser Gly Asp Val Thr Ala Glu Phe Thr Arg Pro Asp Ser Cys Pro
 195 200 205
 Asp Gly Tyr Tyr Ala Gly Phe Ser Ile Met Asn Ile Leu Asn Lys Ala
 210 215 220
 Ala Pro Met Gly Gln Asn Ala Gly Val Gly Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Val Gly Val Gly Asn Leu Thr Asp Asp Glu Glu Lys Ala
 245 250 255
 His Phe Ser Met Trp Ala Met Val Lys Ser Pro Leu Ile Ile Gly Ala
 260 265 270
 Asn Val Asn Asn Leu Lys Ala Ser Ser Tyr Ser Ile Tyr Ser Gln Ala
 275 280 285
 Ser Val Ile Ala Ile Asn Gln Asp Ser Asn Gly Ile Pro Ala Arg Val
 290 295 300
 Ser Asp Thr Asp Glu Tyr Gly Glu Ile Trp Ser Gly Pro Leu Asp Asn
 305 310 315 320
 Gly Asp Gln Val Val Ala Leu Leu Asn Gly Gly Ser Val Ser Arg Pro
 325 330 335
 Met Asn Thr Thr Leu Glu Ile Asp Ser Leu Gly Lys Lys Leu Thr Ser
 340 345 350
 Thr Asp Asp Leu Trp Ala Asn Arg Val Thr Ala Ser Ile Gly Arg Lys
 355 360 365
 Thr Gly Leu Tyr Glu Tyr Lys Asp Gly Leu Lys Asn Arg Leu Gly Gln
 370 375 380
 Lys Gly Ser Leu Ile Leu Asn Val Pro Ala His Ile Ala Phe Arg Leu
 385 390 395 400
 Arg Pro Ser Ser

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

Glu Gln Thr Ile Ala Asp Thr Leu Gly Pro Gly Gly
 1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

Pro Ser Val Ile Tyr Gly Asn Val Arg Asn
 1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

Glu Val Ala Cys Leu Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln Pro
 1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 297 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1..279

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

GAA TGG ACT TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGA ACT GTT	48
Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val	
1 5 10 15	
TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT	96
Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu	
20 25 30	
CCG GCT GGT CCG GCG CAA CAC GAT GAA GCT CAA CAA AAT GCT TTT TAT	144
Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr	
35 40 45	
CAA GTC TTA AAT ATG CCT AAC TTA AAT GCT GAT CAA CGC AAT GGT TTT	192
Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe	
50 55 60	
ATC CAA AGC CTT AAA GAT GAT CCA AGC CAA AGT GCT AAC GTT TTA GGT	240
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly	
65 70 75 80	

CAA GCT CAA AAA CTT AAT GAC TCT CAA GCT CCA AAA TAAGGATCCC 286
Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
85 90
GGAATTCGGC C 297

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 92 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TOPOLOGIA: linear

(ii) MOLÉCULA TIPO: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val
1 5 10 15
Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
20 25 30
Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
35 40 45
Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
50 55 60
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
65 70 75 80
Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
85 90

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:

CCGAATTCAT CCTCTCCGCT CACCGTC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 32 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:

CCCCGGACCA GCCGGAAGTA AGTCTTTTAA TC 32

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:

CCGCCTGGTC CGGCCCAACA CGATGAAGCT 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

GGCCCAATTC CGGGATCCTT ATTTTGGAGC TTGAGA 36

Lisboa, 2010-05-20

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma α -galactosidase A α 2,6-sialilada humana segregada, em que a referida α -galactosidase A contém manose-6-fosfato, compreendendo:

- (a) cultura de uma célula de mamífero manipulada que expressa α -2,6-sialiltransferase e α -galactosidase A sob condições em que a α -galactosidase A é sobre-expressa e selectivamente segregada para o meio de cultura da célula de mamífero; e
- (b) isolamento da referida α -galactosidase A a partir do meio de cultura celular.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a referida célula expressa di-hidrofolato-redutase (DHFR) e em que a referida α -galactosidase A no meio de cultura celular é obténível por amplificação de uma sequência nucleotídica da α -galactosidase A com metotrexato 1000 μ M.

3. α -Galactosidase A α 2,6-sialilada humana segregada contendo manose-6-fosfato

4. α -Galactosidase A de acordo com a reivindicação 3, obténível pelo método da reivindicação 1 ou 2.

Lisboa, 2010-05-20

RESUMO

"Método para produção de proteínas segregadas"

A presente invenção divulga um método para a produção de uma α -galactosidase A madura segregada biologicamente activa que contém resíduos de ácido siálico em $\alpha 2,6$, compreendendo a cultura de uma célula de mamífero manipulada que expressa α -galactósido- $\alpha 2,6$ -sialiltransferase de modo que a célula é capaz de sialilação de péptidos, em que a célula compreende ainda uma sequência nucleotídica que regula a expressão génica operativamente associada a uma sequência do gene da α -galactosidase A sob condições em que a α -galactosidase A é suficientemente sobre-expressa pela célula de mamífero manipulada para que ser selectivamente segregada para a cultura da célula de mamífero na forma de uma α -galactosidase A madura biologicamente activa que contém resíduos ácido siálico em $\alpha 2,6$; e o isolamento da α -galactosidase A madura biologicamente activa que contém resíduos ácido siálico em $\alpha 2,6$ a partir da cultura de células de mamífero.

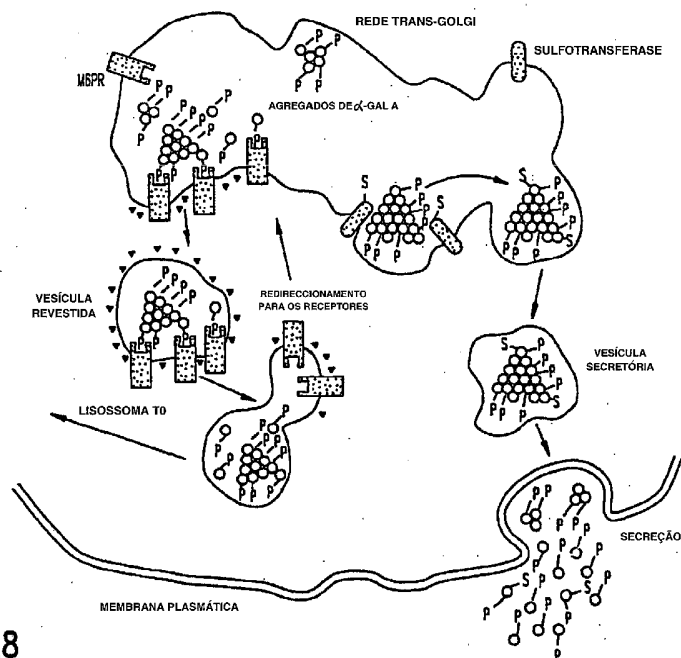


FIG.28

-60	ATCT TAAAGCCCA GGTACCCGC GGAAATTAT GCTGTCCGGT CACCGTGACA	AGGTTA -1
1	ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA CTA CAT CTG GGC TGC GCG CTT GCG	
1	Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala	
	CTT CGC TTC CTG GCC CTC GTT TCC TGG GAC ATC CCT GGG GCT AGA	90
	Leu Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg	30
91	GCA CTG GAC AAT GGA TTG GCA AGG ACG CCT ACC ATG GGC TGG CTG	
31	Ala Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu	
	N-Ter	
	CAC TGG GAG CGC TTC ATG TGC AAC CTT GAC TGC CAG GAA GAG CCA	180
	His Trp Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro	60
		Ser Arg
181	GAT TCC TGC ATC AGT GAG AAG CTC TTC ATG GAG ATG GCA GAG CTC	
61	Asp Ser Cys Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu	
	X X Ser	
	ATG GTC TCA GAA GGC TGG AAG GAT GCA GGT TAT GAG TAC CTC TGC	270
	Met Val Ser Glu Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys	90
271	ATT GAT GAC TGT TGG ATG GCT CCC CAA AGA GAT TCA GAA GGC AGA	
91	Ile Asp Asp Cys Trp Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg	
	CTT CAG GCA GAC CCT CAG CGC TTT CCT CAT GGG ATT CGC CAG CTA	360
	Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu	120
361	GCT AAT TAT GTT CAC AGC AAA GGA CTG AAG CTA GGG ATT TAT GCA	
121	Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala	
	GAT GTT GGA AAT AAA ACC TGC GCA GGC TTC CCT GGG AGT TTT GGA	450
	Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly	150
	CHO -----	
451	TAC TAC GAC ATT GAT GCC CAG ACC TTT GCT GAC TGG GGA GTA GAT	
151	Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gly Val Asp	
	CTG CTA AAA TTT GAT GGT TGT TAC TGT GAC AGT TTG GAA AAT TTG	540
	Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu	180

FIG.1A

541 GCA GAT GGT TAT AAG CAC ATG TCC TTG GCC CTG AAT AGG ACT GGC
 181 Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn Arg Thr Gly
 CHO -----

AGA AGC ATT GTG TAC TCC TGT GAG TGG CCT CTT TAT ATG TGG CCC 630
 Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met Trp Pro 210

631 TTT CAA AAG CCC AAT TAT ACA GAA ATC CGA CAG TAC TGC AAT CAC
 211 Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn His
 CHO -----

TGG CGA AAT TTT GCT GAC ATT GAT GAT TCC TGG AAA AGT ATA AAG 720
 Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys 240
 Asn X

T-49-----

721 AGT ATC TTG GAC TGG ACA TCT TTT AAC CAG GAG AGA ATT GTT GAT
 241 Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp

GTT GCT GGA CCA GGG GGT TGG AAT GAC CCA GAT ATG TTA GTG ATT 810
 Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile 270

811 GGC AAC TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG CAA GTA ACT CAG ATG GCC
 271 Gly Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala

CTC TGG GCT ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC ATG TCT AAT GAC CTC 900
 Leu Trp Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu 300
 CB-I-----

901 CGA CAC ATC AGC CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT CAG GAT AAG GAC
 301 Arg His Ile Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp
 X X

T-538-----

GTA ATT GCC ATC AAT CAG GAC CCC TTG GGC AAG CAA GGG TAC CAG 990
 Val Ile Ala Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln 330
 Arg Glu

FIG.1B

```

991 CTT AGA CAG GGA GAC AAC TTT GAA GTG TGG GAA CGA CCT CTC TCA
331 Leu Arg Gln Gly Asp Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser
      Leu                      Gly Ser Lys      X
      T-88 _____

      GGC TTA GCC TGG GCT GTA GCT ATG ATA AAC CGG CAG GAG ATT GGT 1080
      Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly 360
      _____

1081 GGA CCT CGC TCT TAT ACC ATC GCA GTT GCT TCC CTG GGT AAA GGA
361 Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly

      GTG GCC TGT AAT CCT GCC TGC TTC ATC ACA CAG CTC CTC CCT GTG 1170
      Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val 390

1171 AAA AGG AAG CTA GGG TTC TAT GAA TGG ACT TCA AGG TTA AGA AGT
391 Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser
      T-51 _____
      T-53A _____

      CAC ATA AAT CCC ACA GGC ACT GTT TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA 1260
      His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr 420
      CHD -----

1261 ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT TAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
421 Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ter 429

      AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 1333

```

FIG.1C

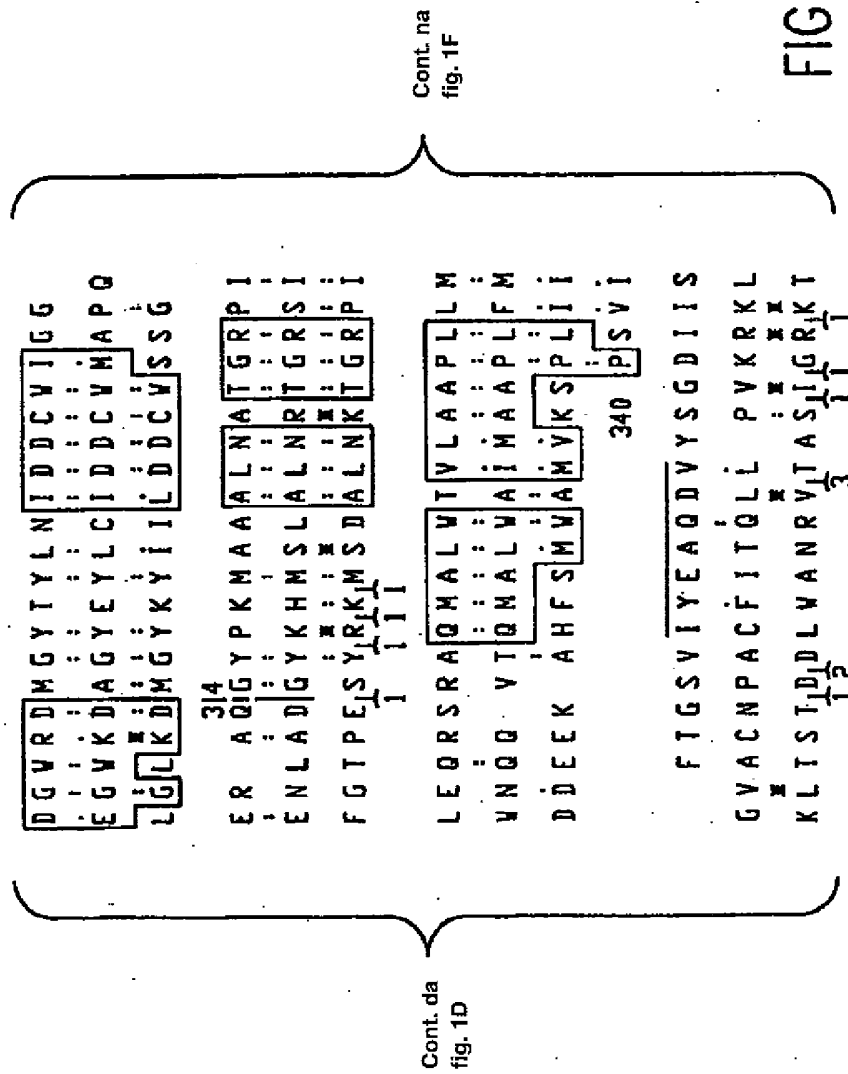


FIG. 1E

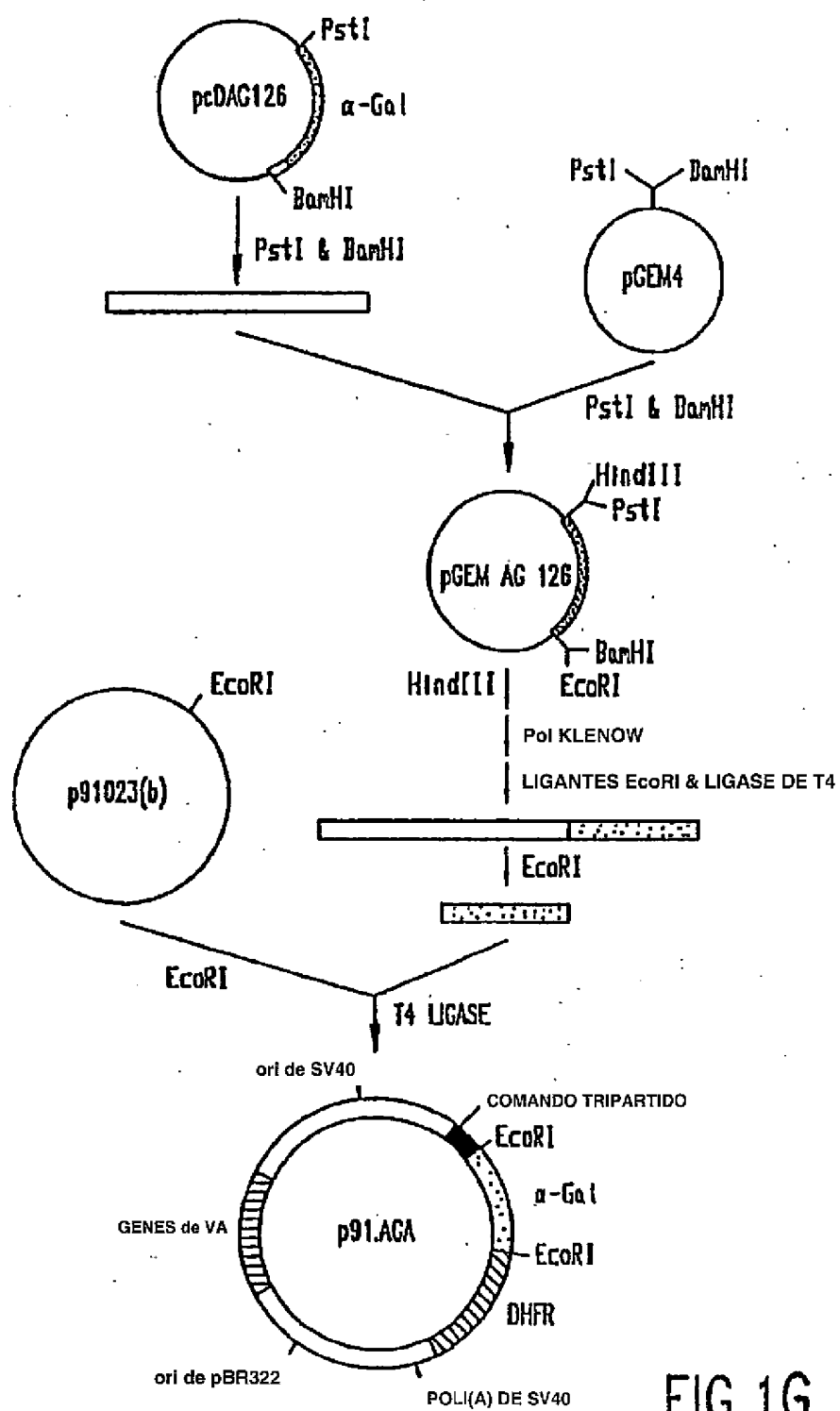


FIG.1G

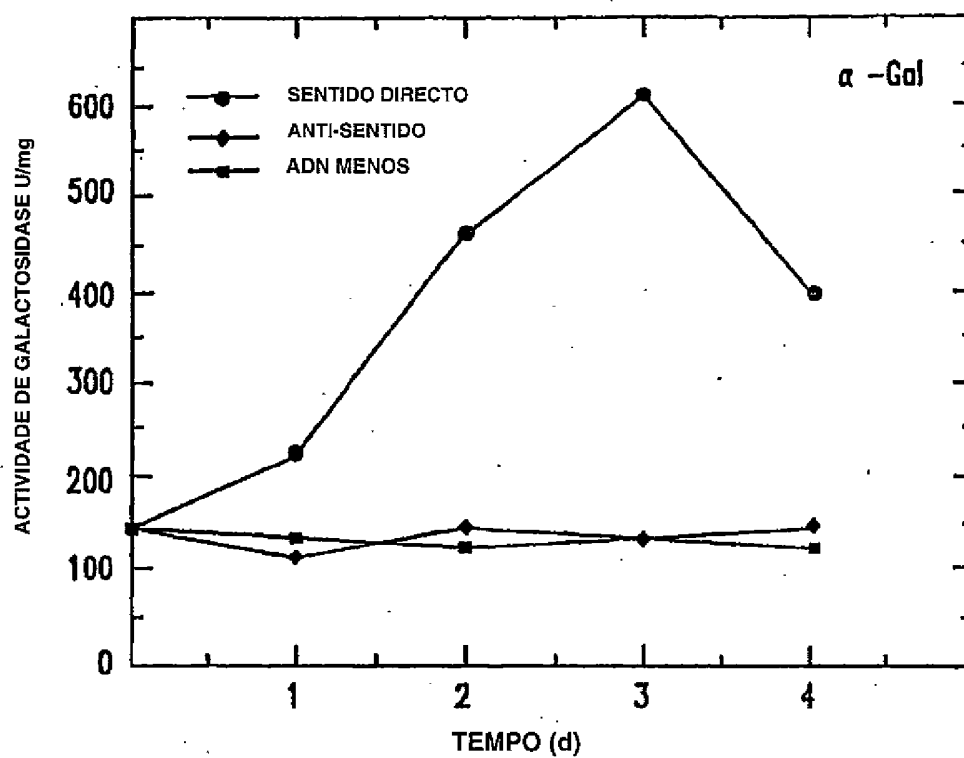


FIG.2A

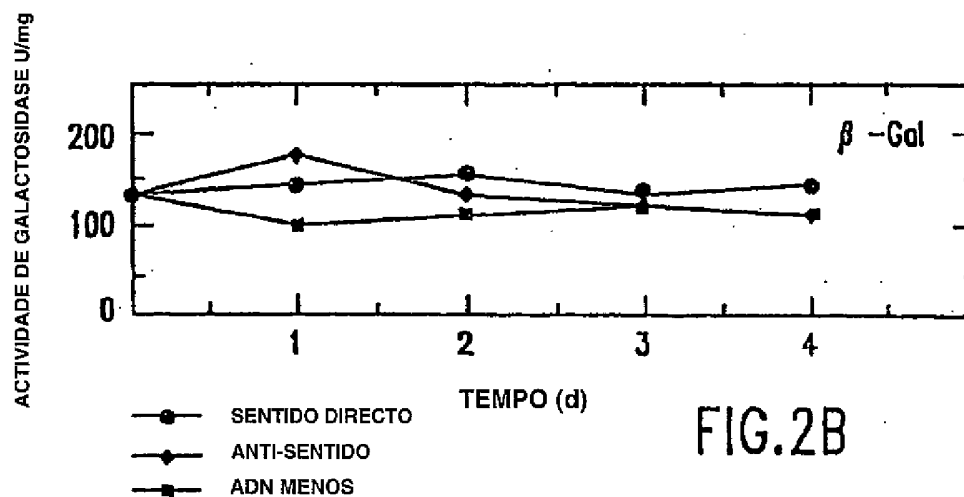


FIG.2B

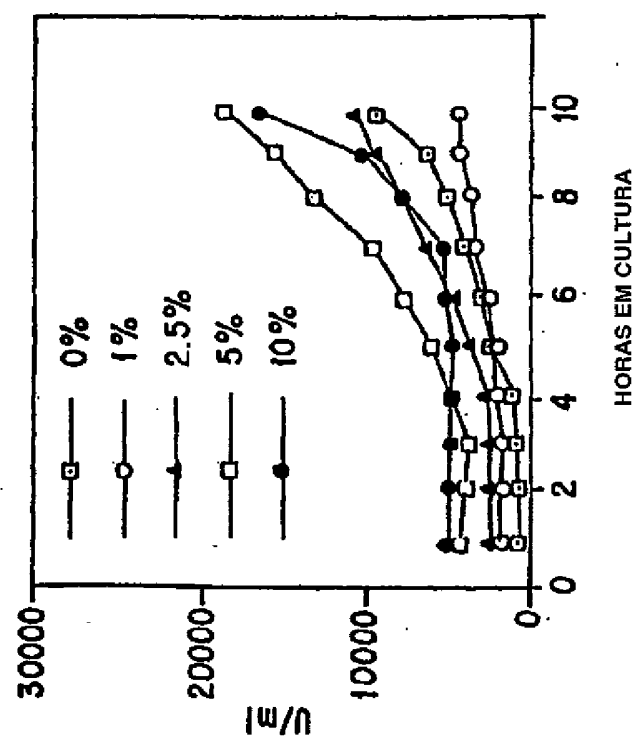


FIG. 3B

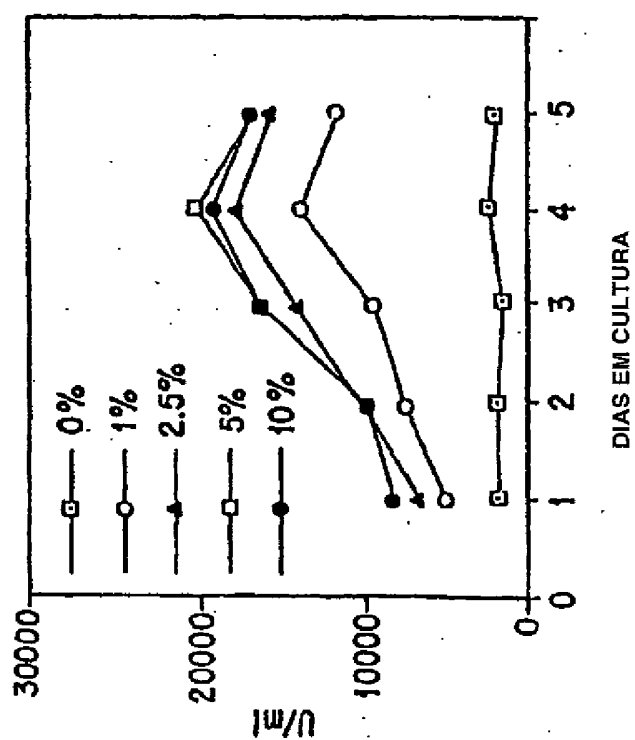


FIG. 3A

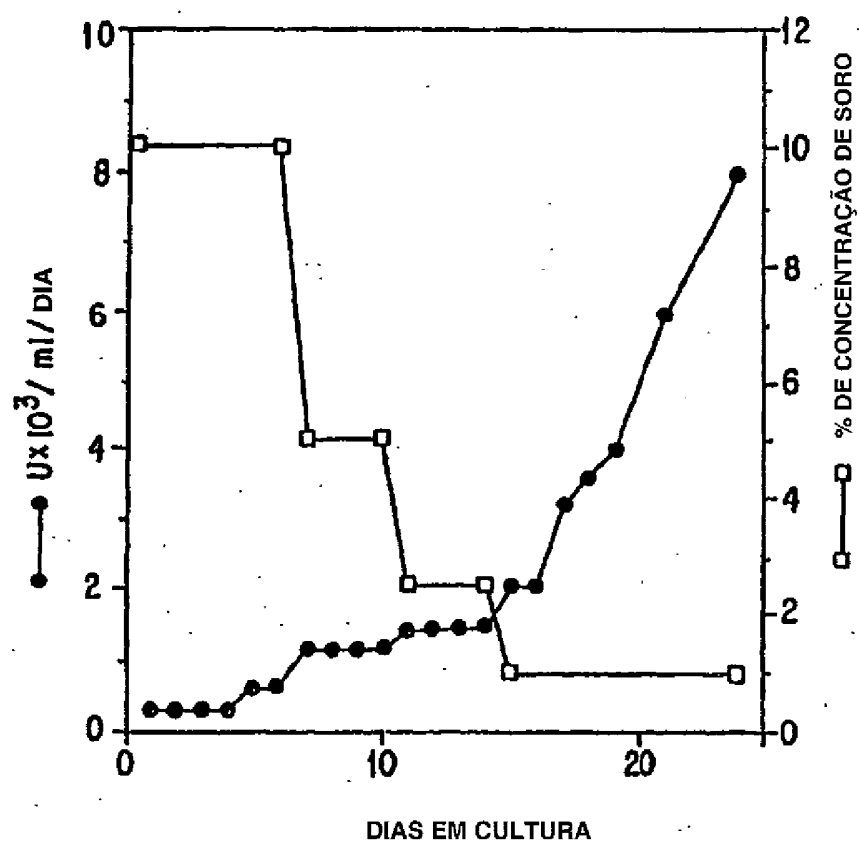


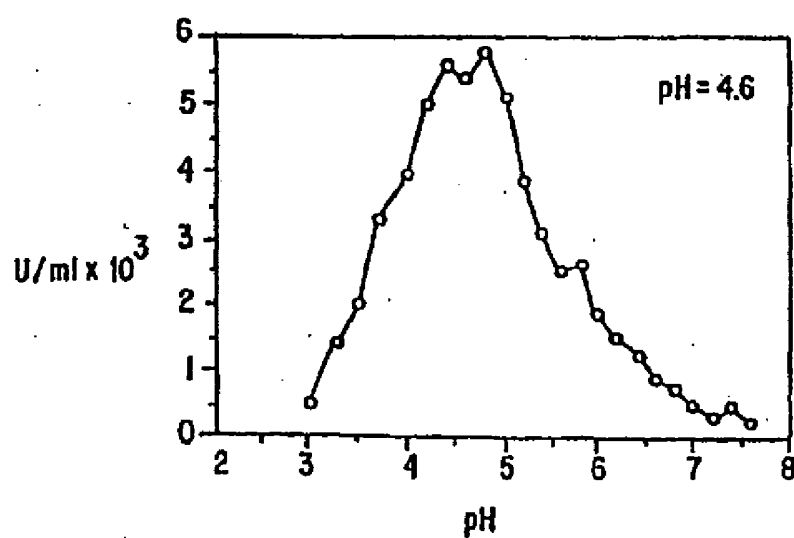
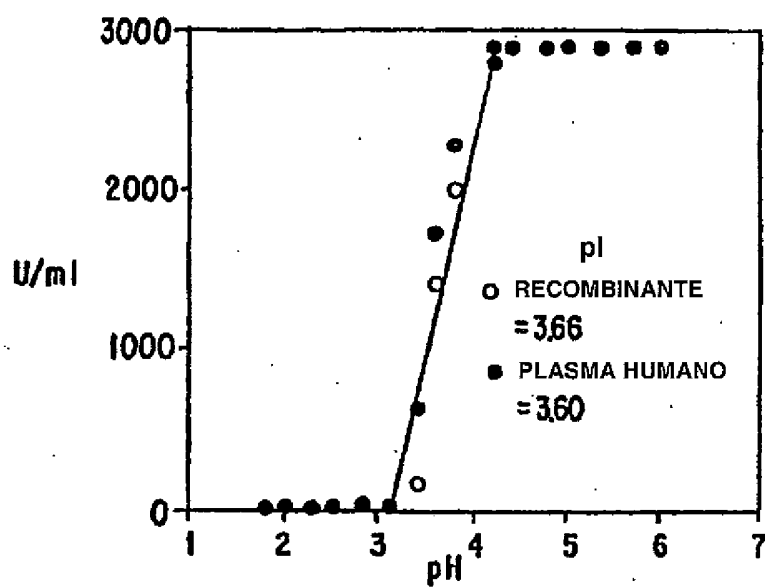
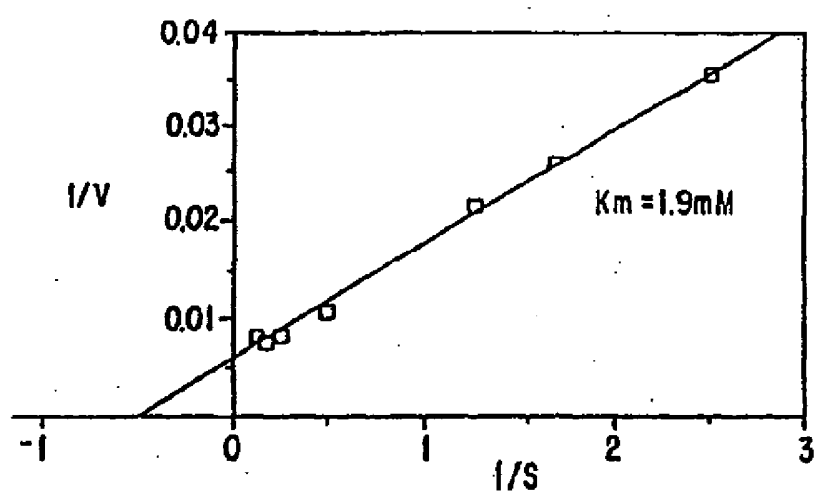
FIG. 4



FIG.5



FIG.6



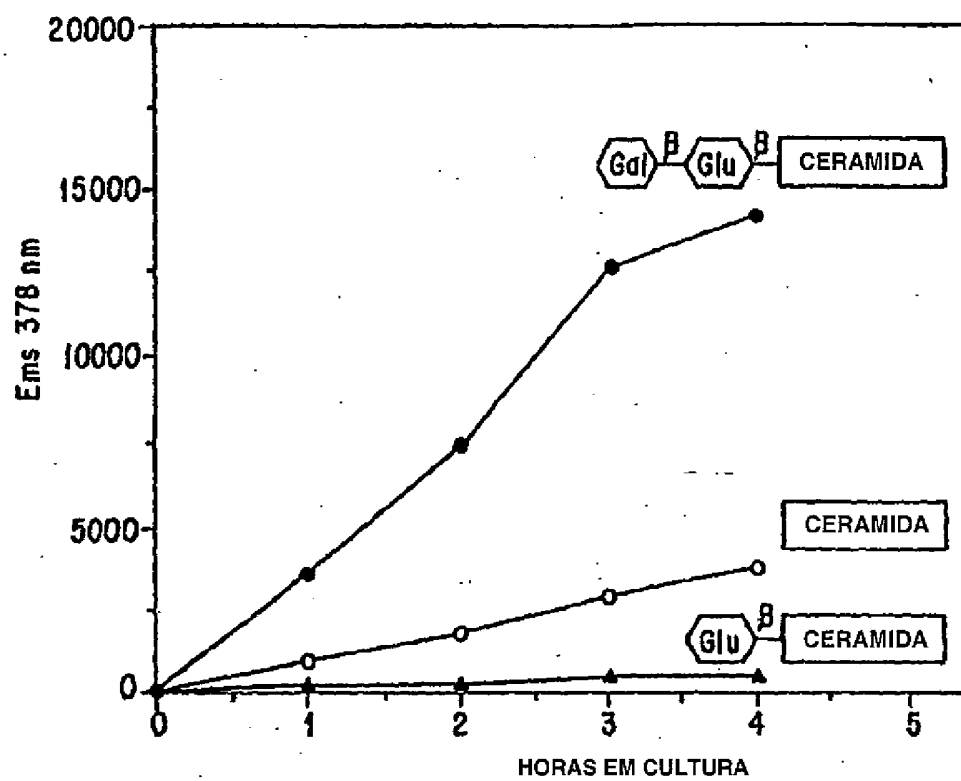


FIG. 8A

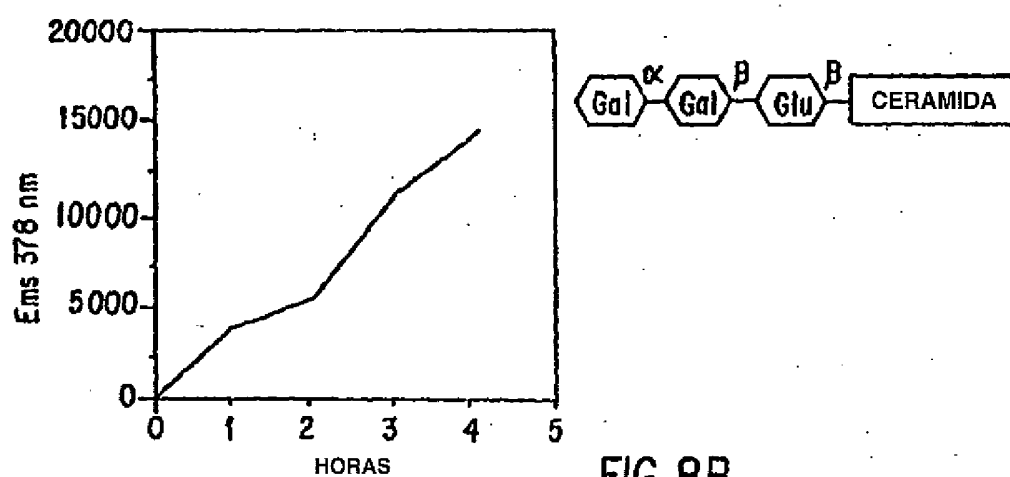


FIG. 8B

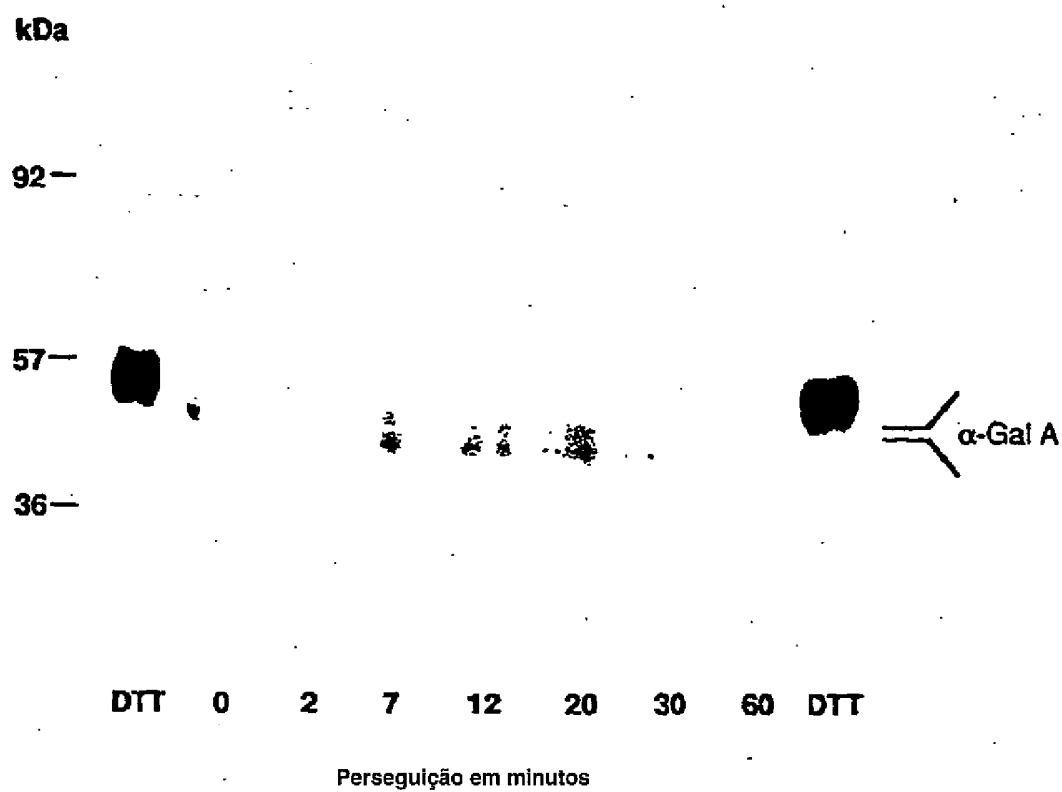


FIG.9



FIG.10

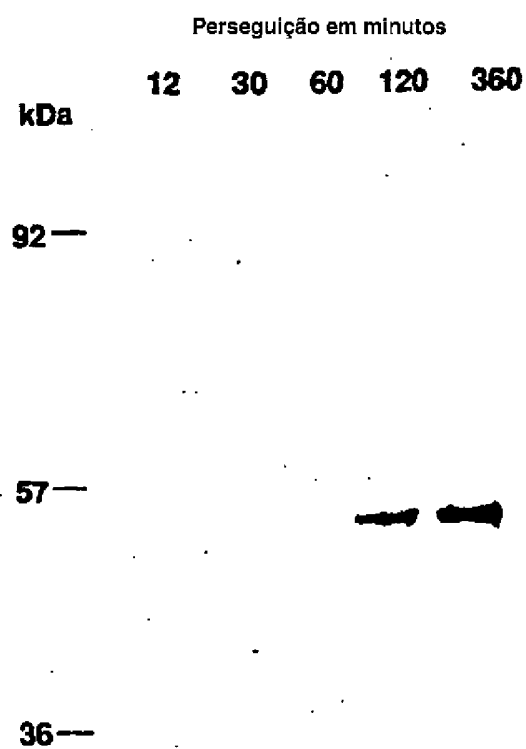


FIG.11

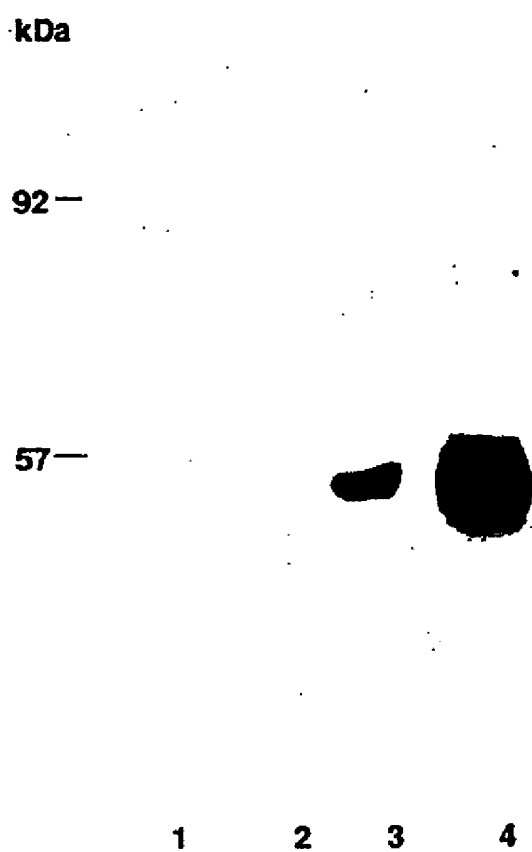


FIG.12

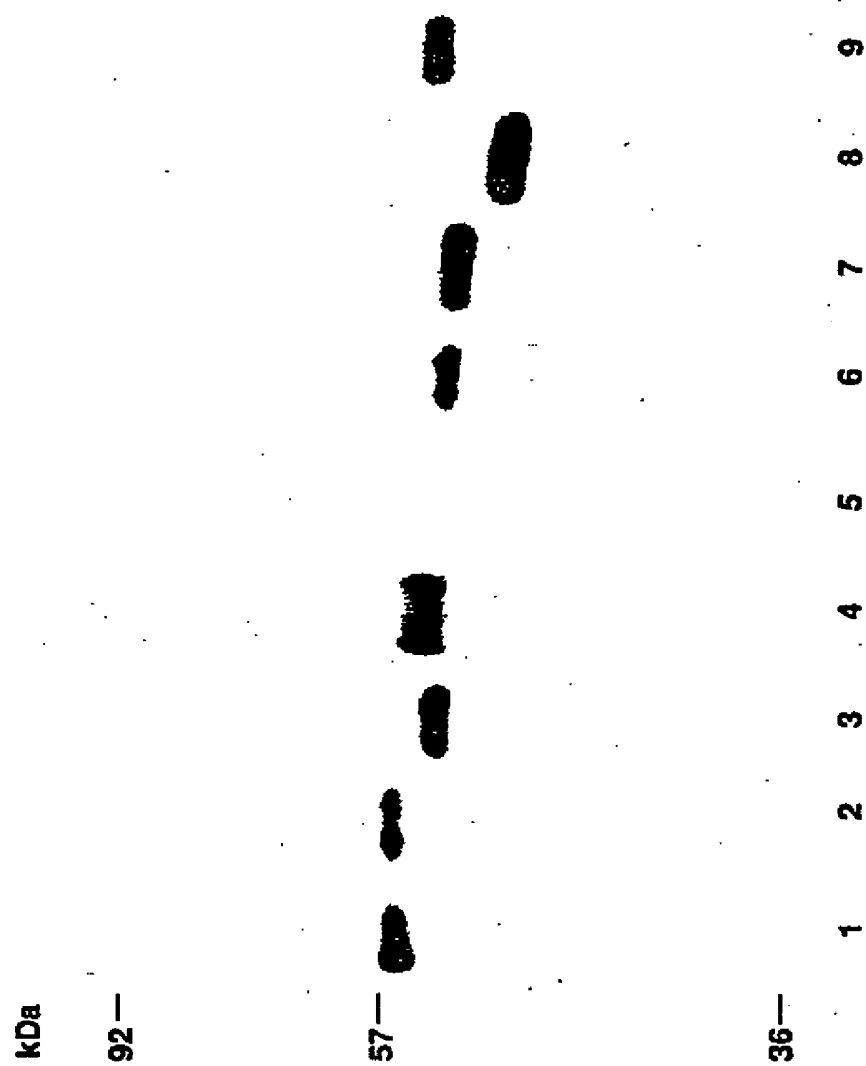


FIG.13

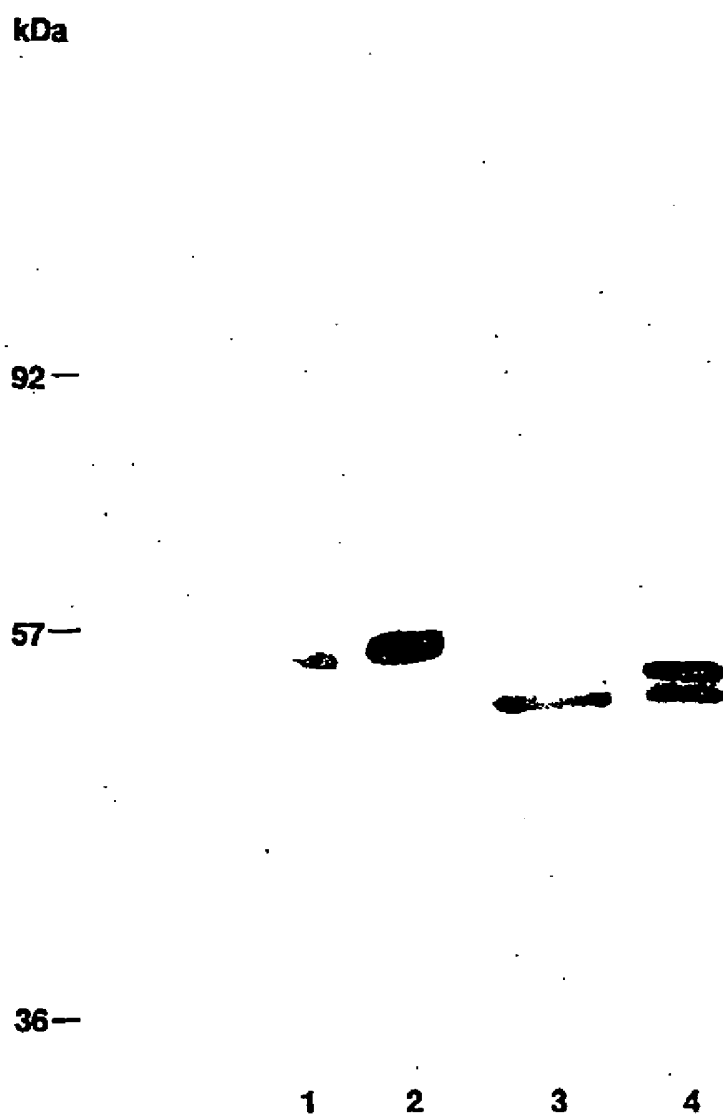


FIG.14

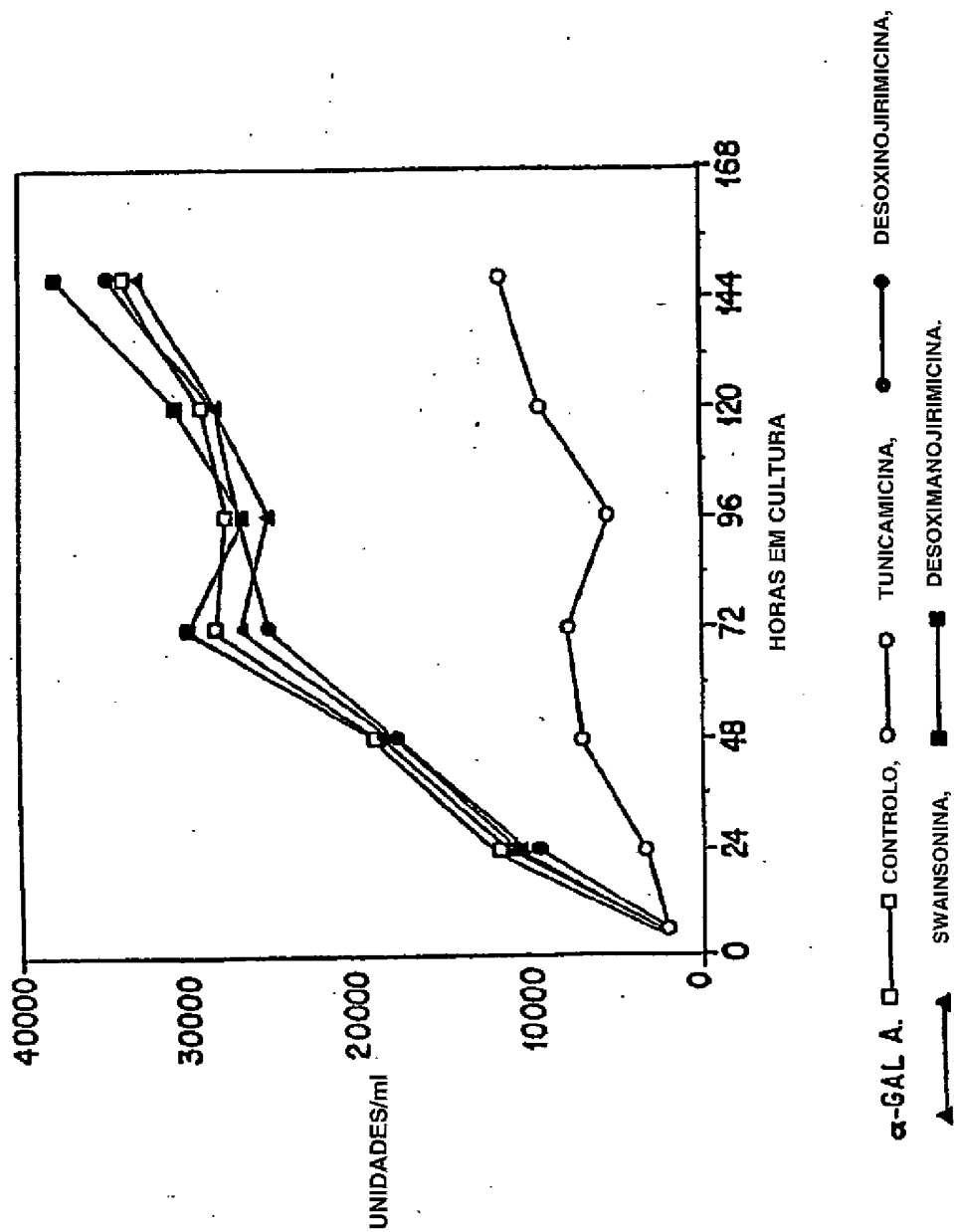


FIG.15

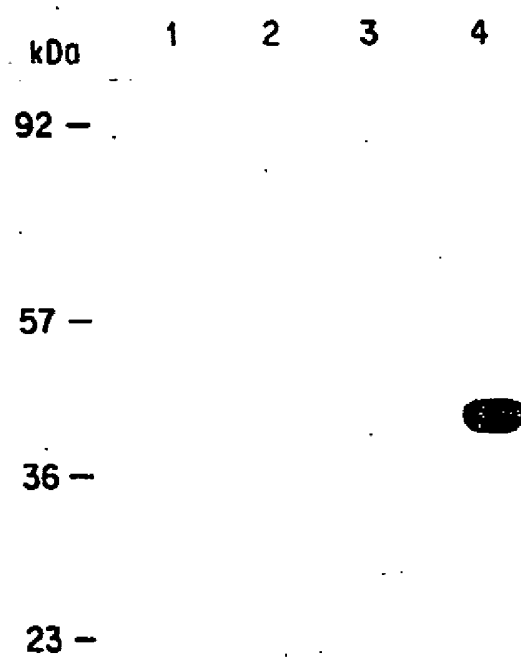


FIG.16

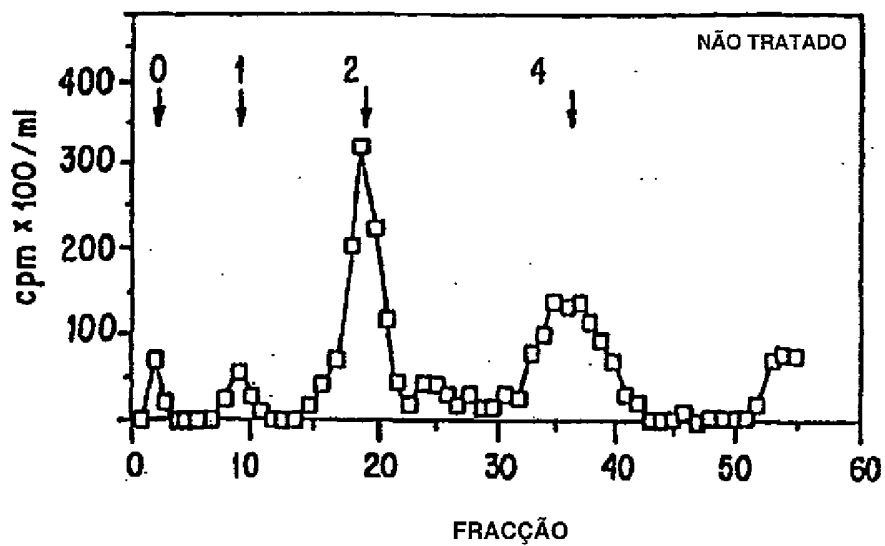


FIG.17A

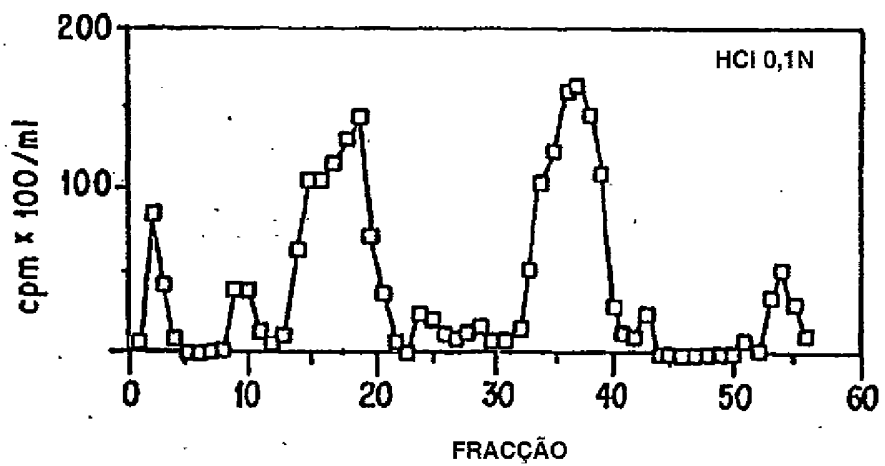


FIG.17B

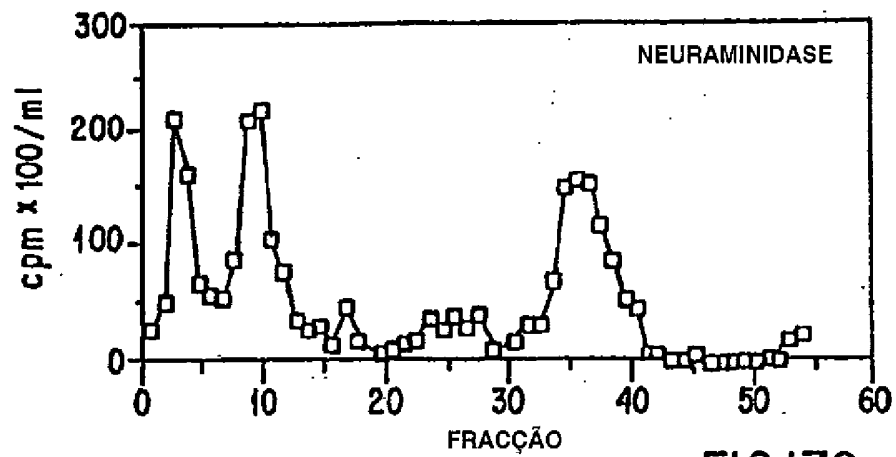


FIG.17C

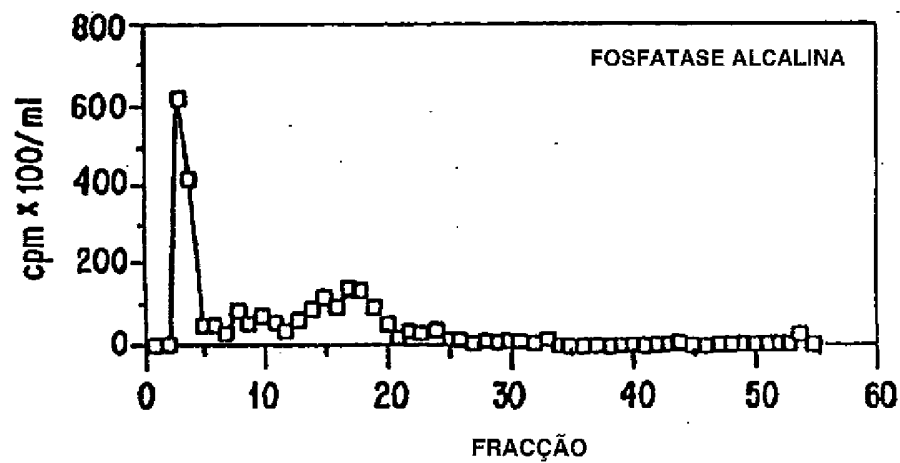


FIG.17D

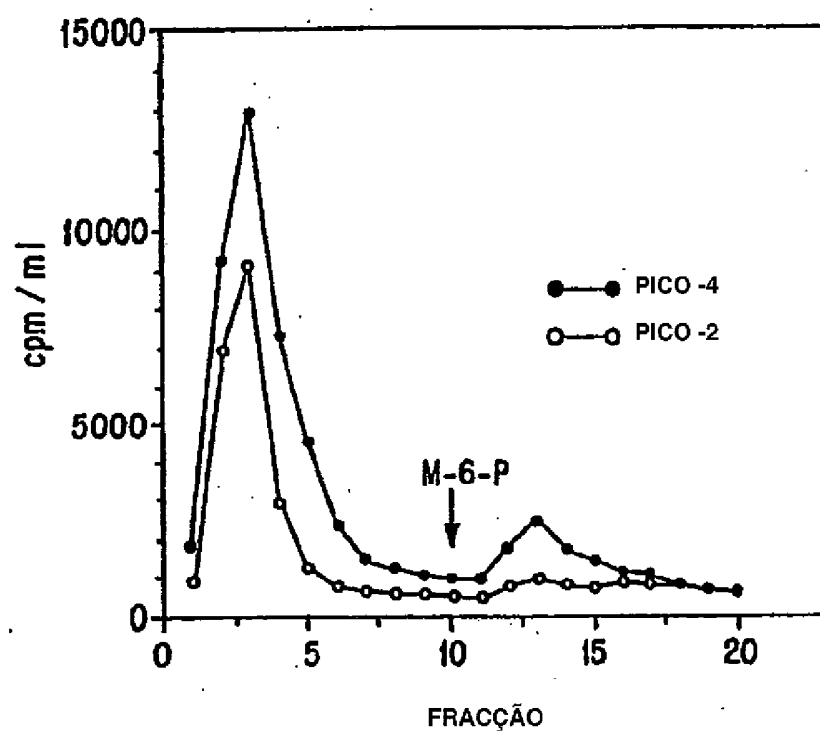


FIG.18

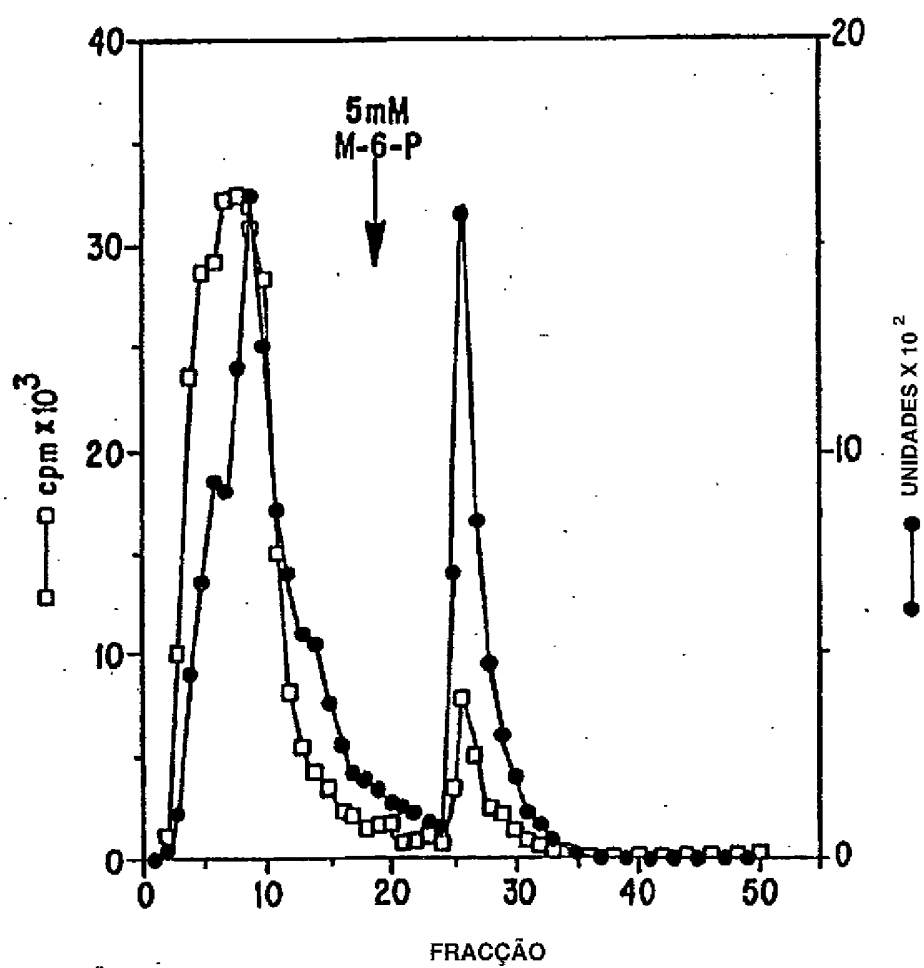
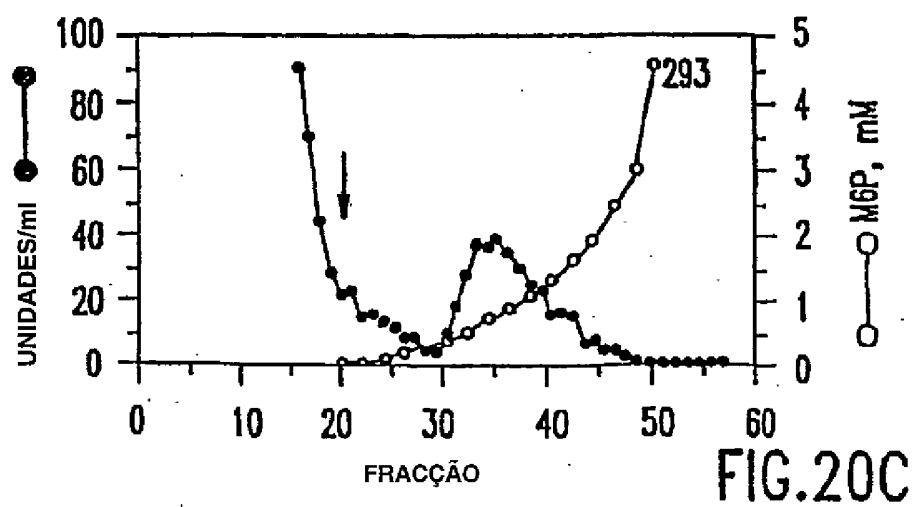
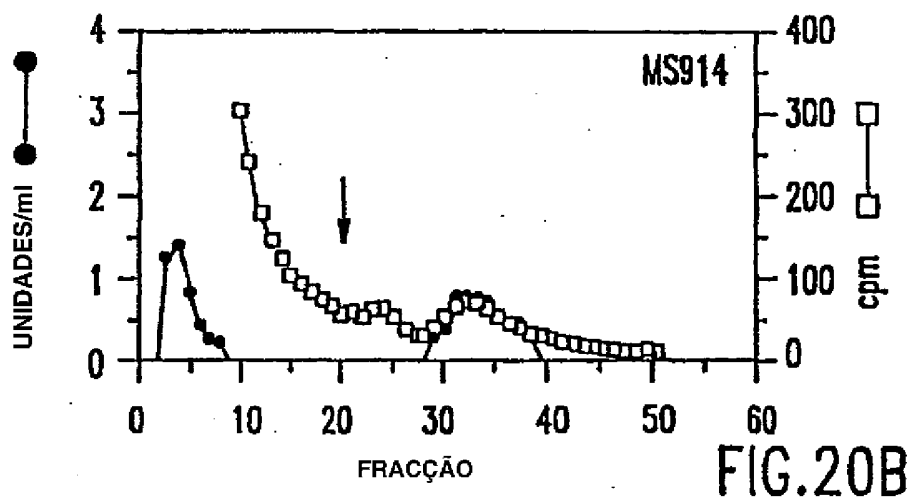
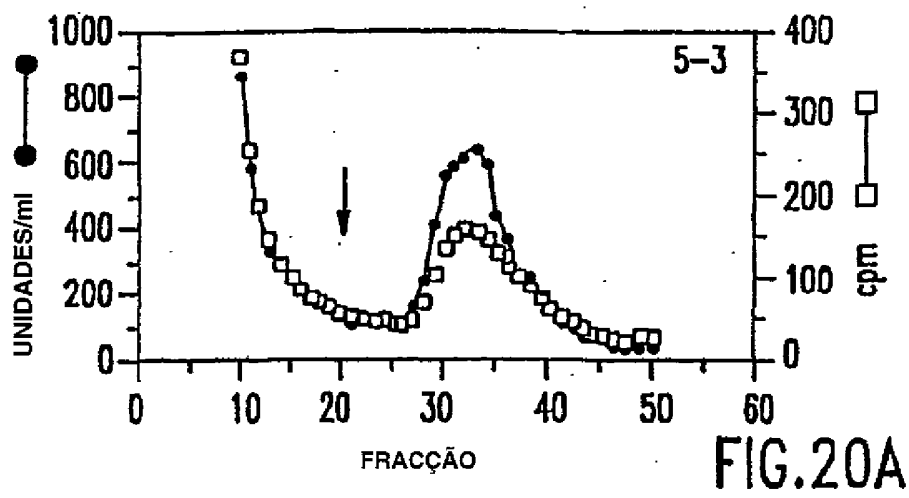


FIG. 19



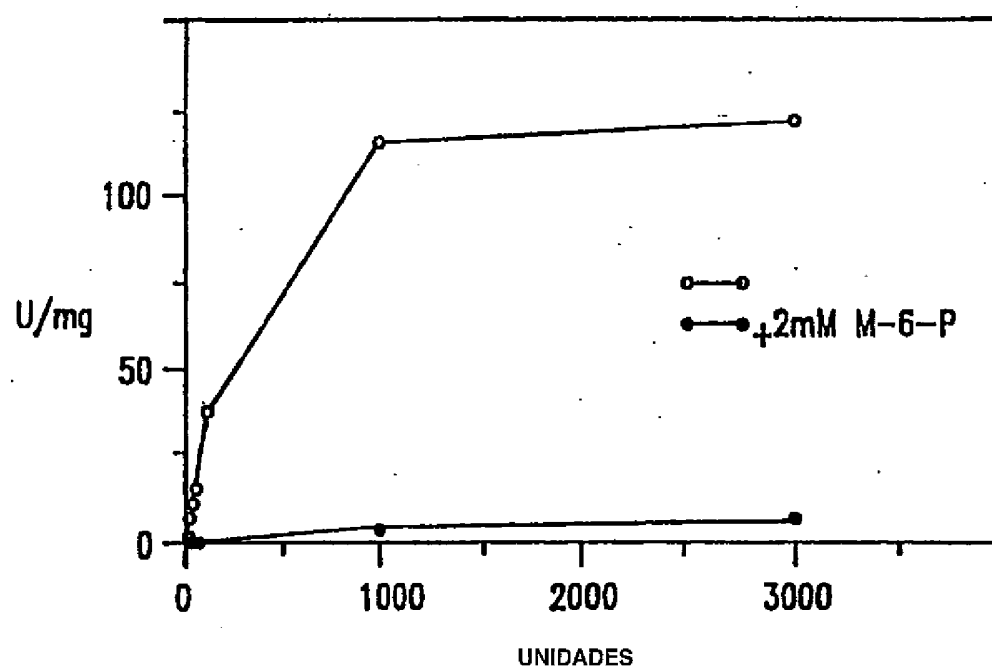


FIG.21

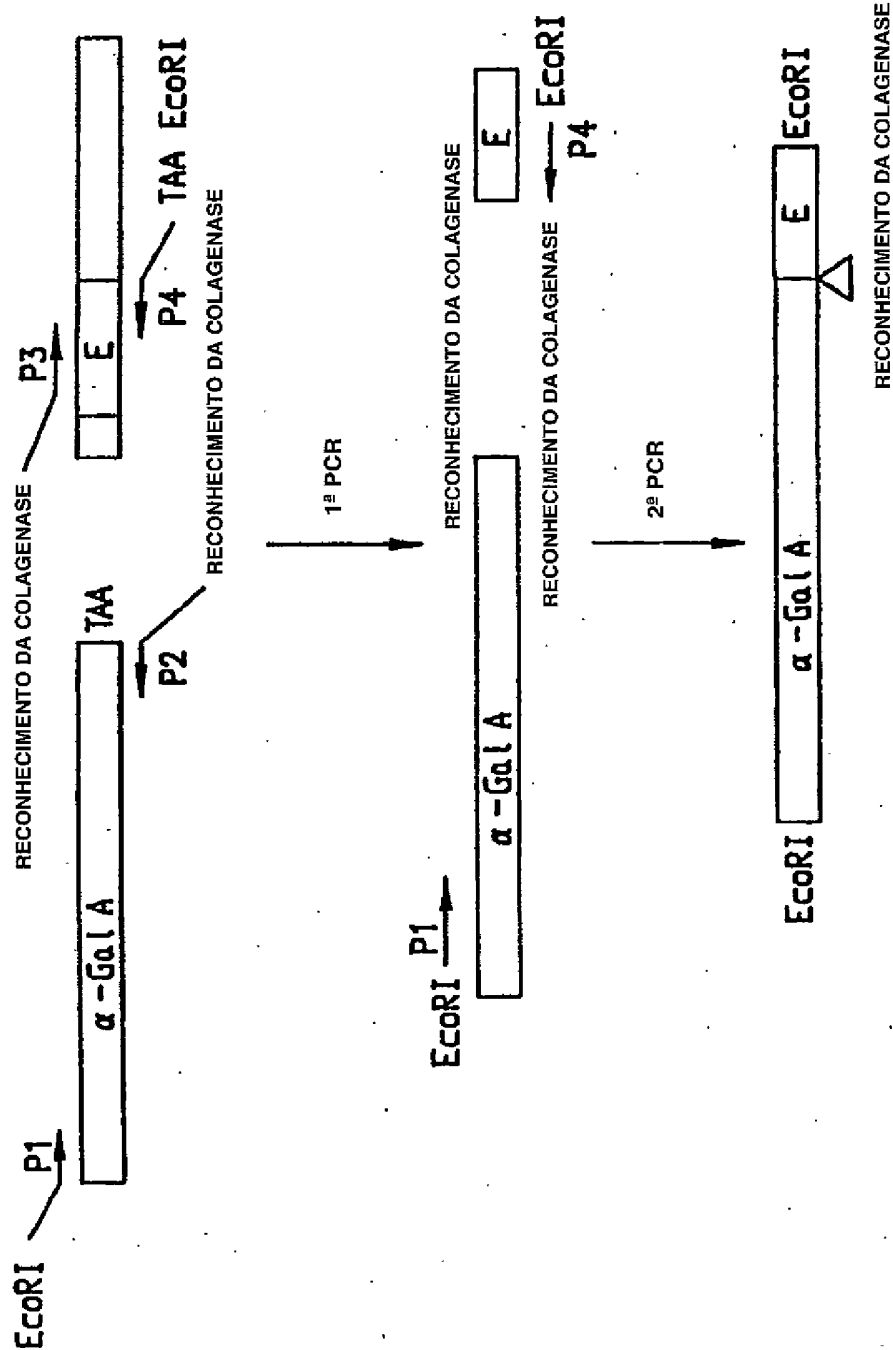


FIG.22

1191 GAA TGG ACT TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGA ACT
 398 Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr

1226 GTT TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC
 413 Val Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp

Clivagem por collagenase

1271 TTA CTT CCG GCT GGT CCG GCG CAA CAC GAT GAA GCT CAA CAA AAT
 428 Leu Leu Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn

α -Gal A

domínio E de ligação a IgG

1316 GCT TTT TAT CAA GTC TTA AAT ATG CCT AAC TTA AAT GCT GAT CAA
 443 Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln

1371 CGC AAT GGT TTT ATC CAA AGC CTT AAA GAT GAT CCA AGC CAA AGT
 450 Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser

1416 GCT AAC GTT TTA GGT GAA GCT CAA AAA CTT AAT GAC TCT CAA GCT
 473 Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala

Bam HI Eco RI
 1501 CCA AAA TAA GGATCCCGAATTCGGCC
 488 Pro Lys Ter

FIG.23

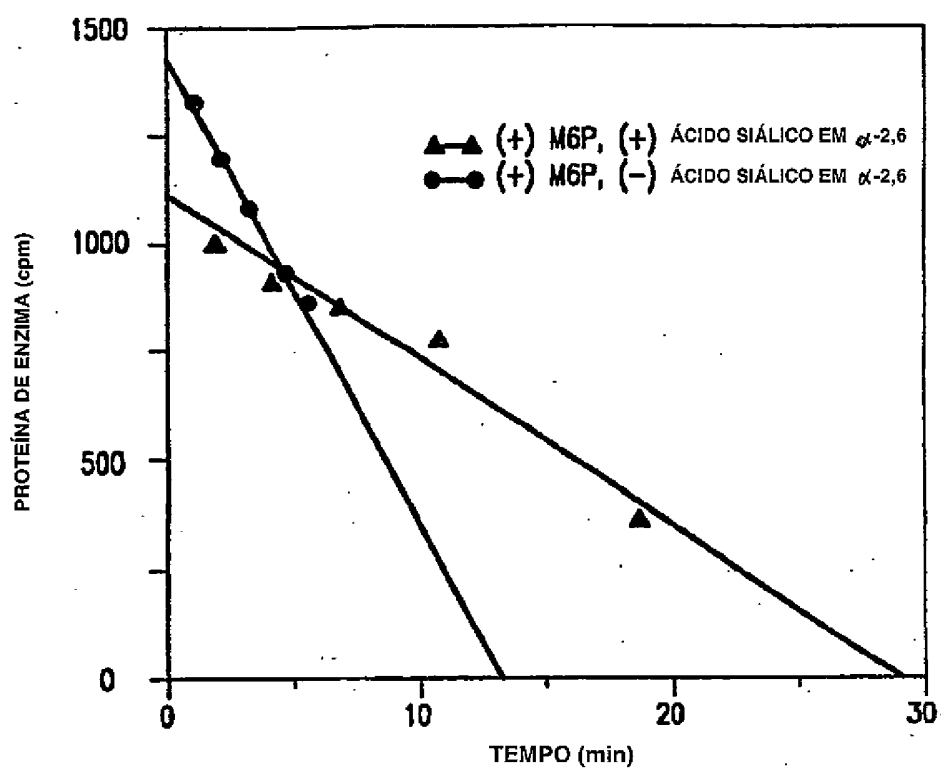


FIG.24A

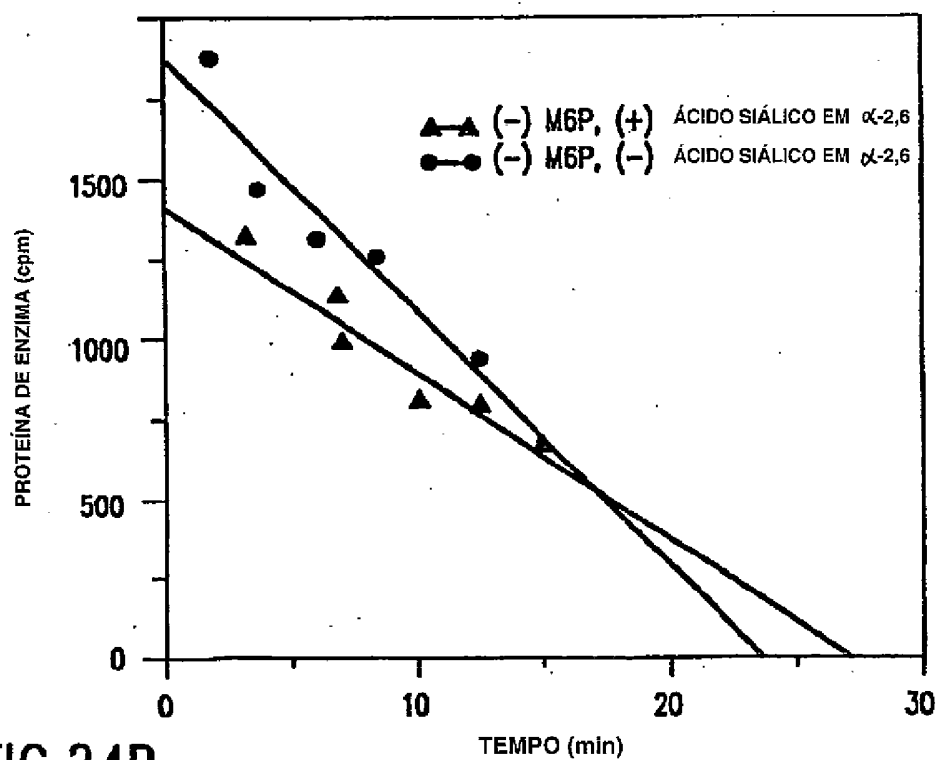


FIG.24B

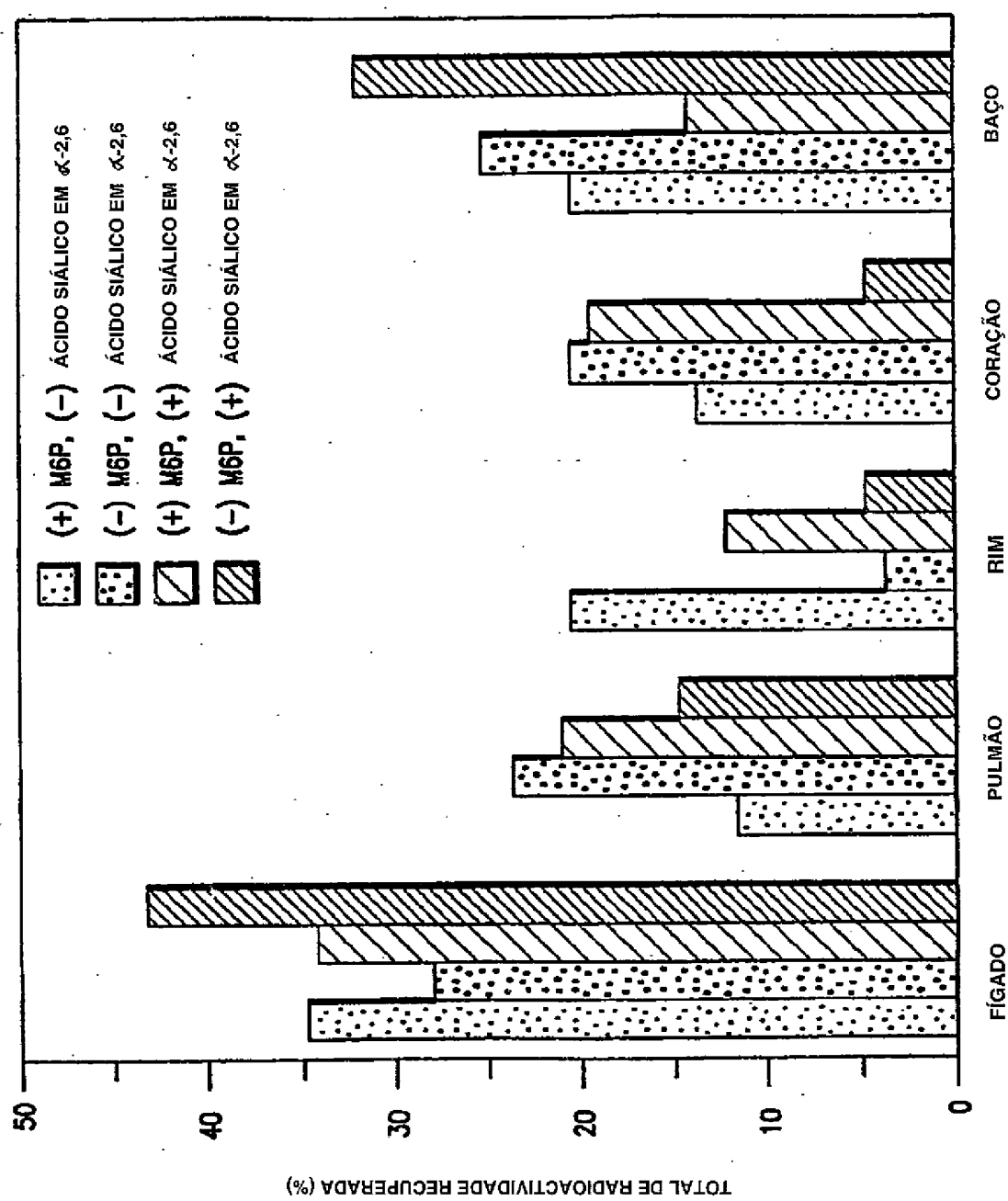


FIG.25

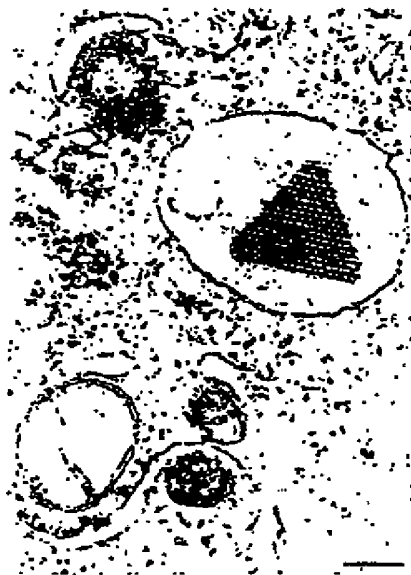


FIG.26A



FIG.26B



FIG. 26C

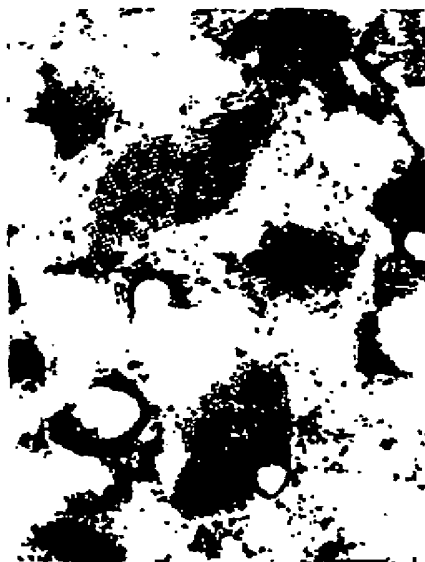


FIG. 26D

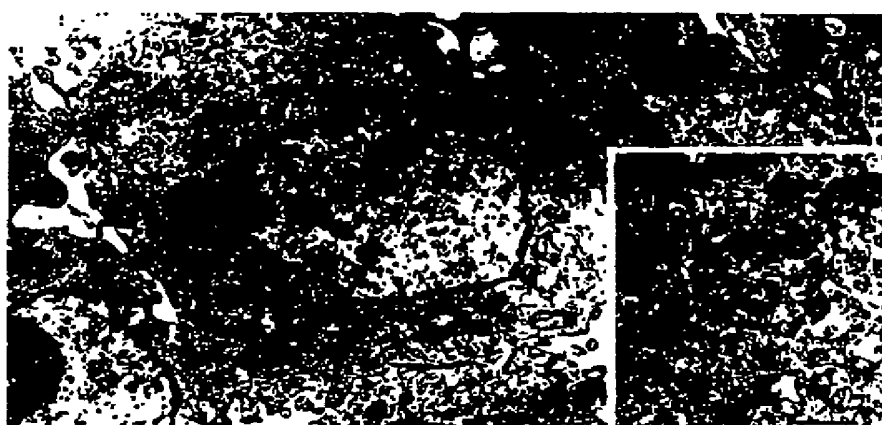
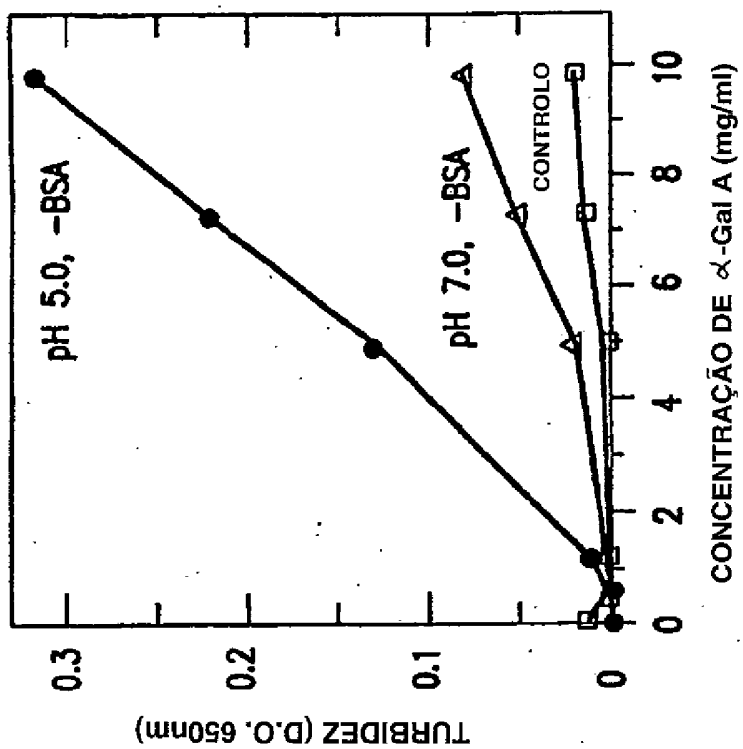
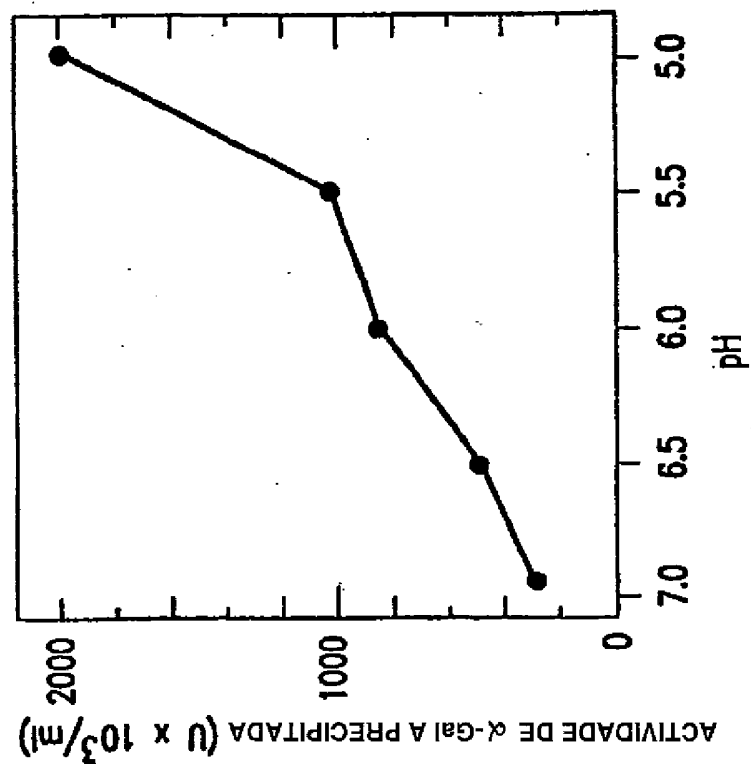


FIG.26E



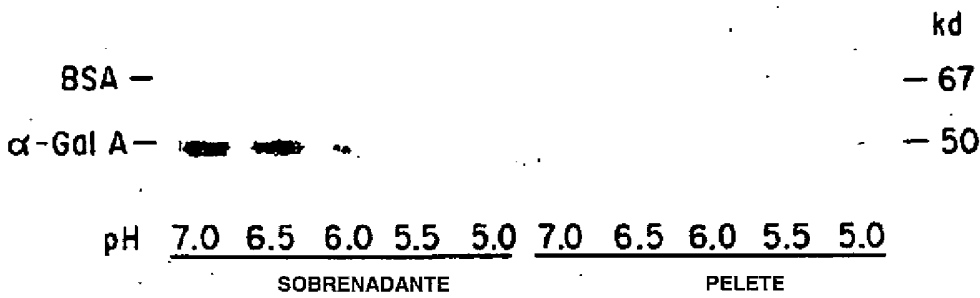


FIG.27C

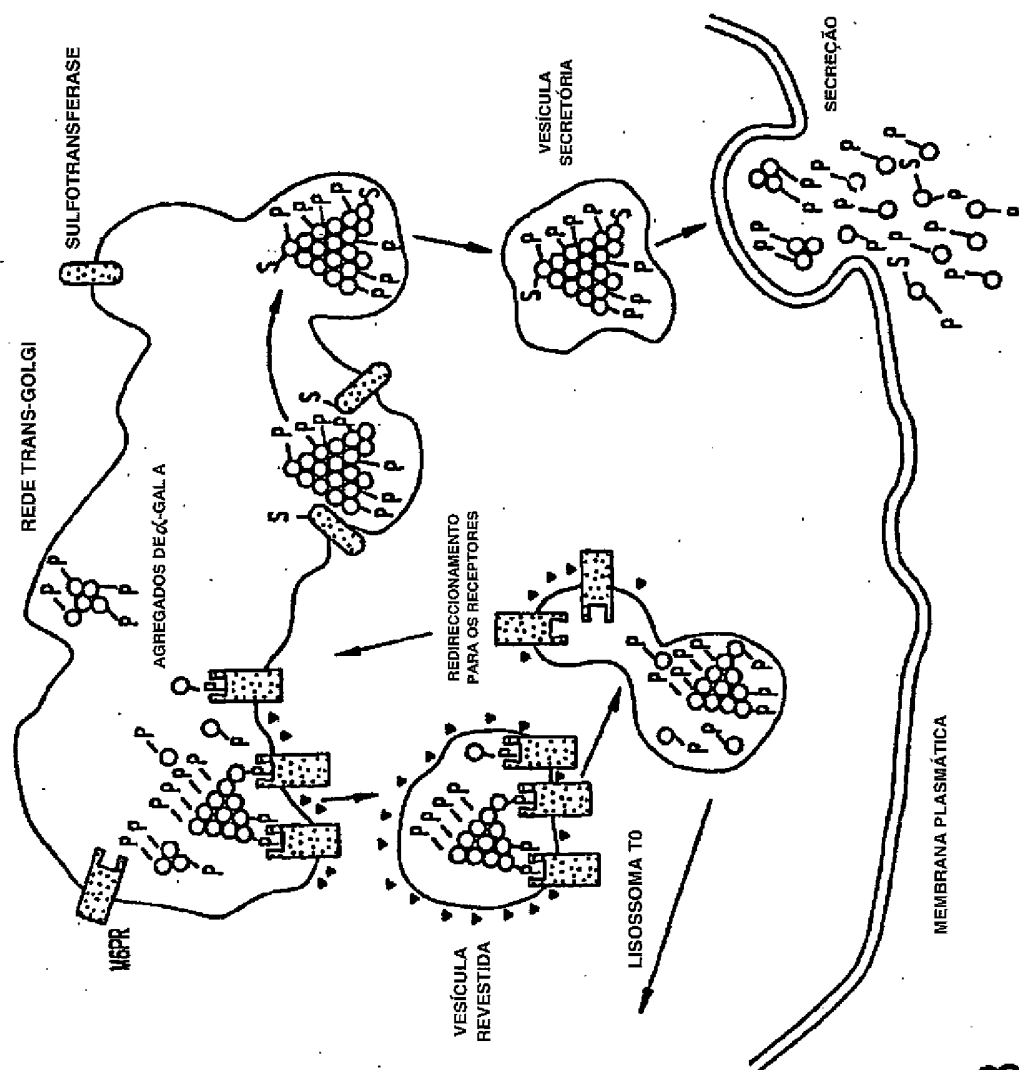


FIG.28