

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 97 383

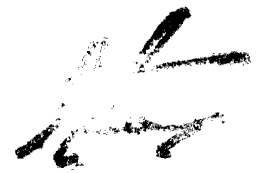
**REQUERENTE:** STROHTECH INC., norte-americana (Estado de Michigan), com sede em 100 River Place, Detroit, Michigan 48207, Estados Unidos da América

**EPÍGRAFE:** "Processo para a produção de uma cadeia de globina, de um seu fragmento de ligação e de hemoglobina, e de composições de hemoglobina"

**INVENTORES:** Joseph De Angelo, Nalini M. Motwani e Wajeeh Bajwa

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América em 16 de Abril de 1990 sob o nº. 07/509 918, em 14 de Novembro de 1990 sob o nº. 07/614 359 e em 12 de Abril de 1991 sob o nº. 07/684 611



PATENTE Nº. 97 383

"Processo para a produção de uma cadeia de globina, de um seu fragmento de ligação e de hemoglobina, e de composições de hemoglobina"

para que

STROHTECH INC., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

#### R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo para a produção de uma cadeia de globina ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de globina ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iii) uma segunda sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) uma origem de replicação de levedura; e (v) uma sequência de terminação da transcrição; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina ou o seu fragmento de ligação a heme.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições de hemoglobina.

MEMÓRIA DESCRITIVA1. CAMPO DA INVENÇÃO

O presente invento refere-se a uma cadeia de globina substancialmente pura ou a um seu fragmento de ligação a heme. A cadeia de globina pode ser uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante. A invenção refere-se adicionalmente a um vector de expressão que, especificamente, compreende sequências de ADN codificando, pelo menos, uma cadeia de globina ou um seu derivado de ligação a heme, ligado operativamente a um promotor de levedura. A invenção descreve também o processo para a produção de uma cadeia de globina, ou de um seu fragmento de ligação a heme, em levedura, e processos para a produção de hemoglobina em levedura. A hemoglobina produzida pelos processos da presente invenção pode ser usada em aplicações que requerem transportadores de oxigénio fisiológico, tais como em soluções de substituição de sangue ou num expensor de plasma.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO2.1. USO DA HEMOGLOBINA COMO SUBSTITUTO DO SANGUE

A transfusão de um paciente com sangue de dador tem um certo número de desvantagens. Em primeiro lugar, pode existir uma carência de um certo tipo de sangue do paciente. Em segundo lugar, existe o perigo de o sangue do dador poder estar contaminado com agentes infecciosos tais como vírus da hepatite, citomegalovirus, vírus de Epstein-Barr, parvovírus do soro, sífilis, malária, filariase, tripanossomíase, babsiose, bactérias, patogénicas e HIV (Bove, 1986, Progr. Hematol. 14:123-145). Em terceiro lugar, o sangue de dador tem um tempo de vida em prateleira limitado.

Uma alternativa à transfusão envolve o uso de um substituto de sangue. Um substituto de sangue é uma solução transportadora de oxigénio que proporciona também a pressão oncótica necessária para manter o volume do sangue. Recentemente, têm-se estudado dois tipos de substitutos, as emulsões de fluorocarboneto e as soluções de hemoglobina.

A hemoglobina, tal como existe nos glóbulos vermelhos, é

composta por duas cadeias de globina do tipo alfa e por duas cadeias de globina do tipo beta, cada uma com um residuo heme. Uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta combinam-se para formar um dímero que é muito estável. Os genes de globina do tipo alfa e do tipo beta são, cada um, uma família de genes de globina relacionados, que são expressos em diferentes estados de desenvolvimento e que são regulados pela pressão de oxigénio, pelo pH e pelo desenvolvimento de embrião para feto para recém-nascido. Doi dímeros alinham-se, então, de uma forma anti-paralela para formar tetrameros. A ligação dos dímeros para formar tetrameros não é tão forte como no caso da ligação dos monómeros que se associam para formar dímeros. Deste modo, os tetrameros têm uma tendência para se separarem para formar dímeros e existe sempre um equilíbrio entre tetrameros, dímeros e monómeros. Para concentrações elevadas de globina, a forma predominante é o tetramero; com a diluição, o dímero torna-se a forma predominante. Este equilíbrio é também afectado pelo solvente, pelos sais, pelo pH e por outros factores, uma vez que as forças de ligação entre os monómeros são, principalmente, electrostáticas.

Os genes de globina do tipo alfa estão integrados, em conjunto, no cromossoma 16 e incluem genes codificando a cadeia de zeta-globina de embrião e a cadeia de alfa-globina de adulto, presentes tanto no feto como no recém-nascido. Os genes da globina do tipo beta residem no cromossoma 11 e incluem genes codificando a cadeia de epsilon-globina de embrião, a cadeia de gama-globina fetal e as cadeias de delta-globina de adulto e de beta-globina de adulto. Identificaram-se dois tipos de cadeias de gama-globina,  $G_{\text{gama}}$  e  $A_{\text{gama}}$ , que diferem pela presença de um único residuo glicina ou alanina, respectivamente, no aminoácido 135 (Schroeder et al., 1968, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 60: 537-544). Verificou-se que a cadeia gama contém um sítio polimórfico na posição 75, que pode ser também ocupado quer por isoleucina quer por treonina. Podem-se formar várias hemoglobinas (revisão bibliográfica em Kutlar et al., 1989, Hemoglobin 13:671-683 e Honig e Adams, Human Hemoglobin Genetics, Springer Verlag, New York pp. 29-33). Exemplos incluem HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ -

delta<sub>2</sub>), HbF (alfa<sub>2</sub>gama<sub>2</sub>), HbBarts (gama<sub>4</sub>), HbH (beta<sub>4</sub>), e Hb Portland I (zeta<sub>2</sub>gama<sub>2</sub>), Hb Portland II (zeta<sub>2</sub>beta<sub>2</sub>), Hb Portland III (zeta<sub>2</sub>delta<sub>2</sub>), Hb Gower I (zeta<sub>2</sub>epsilon<sub>2</sub>), e Hb Gower II (alfa<sub>2</sub>epsilon<sub>2</sub>).

Contudo, existem obstáculos à utilização de hemoglobina nativa como substituto do sangue. Em primeiro lugar, são necessárias grandes dosagens (Walder, 1988, Biotech '88, San Francisco, Nov. 14-16, 1988). Uma unidade simples (450 ml) de uma solução de hemoglobina a 10% contém 45 g de proteína. Estima-se que nos E.U.A., por ano, se visam pelo menos 12 milhões de unidades de sangue. Deste modo seria necessária uma produção de 450 000 kg de hemoglobina por ano. Em segundo lugar, é importante obter hemoglobina que esteja isenta de agentes infecciosos e de substâncias tóxicas. Em terceiro lugar, tal como anteriormente se referiu, ainda que a hemoglobina seja, normalmente, um tetramero com um peso molecular de 64 000, pode-se dissociar para formar dímeros alfa-beta. Os dímeros são rapidamente eliminados pelos rins e o tempo de residência é demasiado curto para que a hemoglobina isenta de células seja útil como substituto do sangue. Em quarto lugar, a hemoglobina isenta de células tem uma afinidade por oxigénio demasiado elevada para libertar eficazmente o oxigénio para os tecidos, devido à ausência do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Os esforços para restaurar o 2,3-DPG têm sido mal sucedidos uma vez que o 2,3-DPG é rapidamente eliminado da circulação.

Têm sido tentadas várias abordagens para obviar estas dificuldades. Estas incluem a expressão da hemoglobina via sistemas de ADN recombinante, modificação química da hemoglobina e produção de variantes da hemoglobina.

#### 2.1.1. EXPRESSÃO DE HEMOGLOBINA RECOMBINANTE

Clonaram-se e sequenciaram-se a zeta-globina de embrião humano (Cohen-Sohal, 1982, DNA 1:355-363), a epsilon-globina de embrião humano (Baralle et al., 1980, Cell 21:621-630), a gama-globina de feto humano (Slightom et al., 1980, Cell 21:627-630), a delta-globina de adulto humano (Spritz et al., 1980, Cell 21:639-645), o ADN genómico da alfa-globina de adulto humano (Lie-

bhaber et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:7054-7058) e o ADNc da beta-globina de adulto humano (Marotta et al., 1977, J. Biol. Chem. 252: 5040-5053).

Exprimiram-se, em sistemas bacterianos, as globinas alfa e beta de adulto humano. Nagai et al. (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:7252-7255 e 1984, Nature (London) 309:810-812) exprimiu a beta-globina de adulto em E. coli na forma de uma proteína híbrida consistindo nos 31 resíduos amino-terminais da proteína lambda cII, num ligador Ile-Glu-Gly-Arg e na cadeia completa de beta-globina de adulto humano. O híbrido foi clivado na única arginina com factor de coagulação do sangue Xa, resultando na libertação da cadeia de beta-globina. O Pedido PCT nº. PCT/US88/01534 (Publicação nº. WO 88/091799, publicada em 1 de Dezembro de 1988) descreve a expressão de uma sequência de ADN codificando o gene da alfa-globina de adulto e a sequência de 20 aminoácidos N-terminal da beta-globina, na qual as sequências da alfa-globina e de beta-globina estão separadas por um espaçador de ADN codificando um sítio de clivagem do factor Xa.

Têm sido desenvolvidos vários esforços para segregar beta-globina no periplasma de E. coli, no qual o gene de beta-globina foi inserido atrás de uma sequência de sinal de secreção OmpA (Brinigar et al., 1988, Symposium on Oxygen Binding Heme Proteins-Structure, Dynamics, Function and Genetics). Contudo, verificou-se que ainda que a fusão tivesse sido correctamente processada, a beta-globina não era segregada.

Nagai et al. (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:7252-7255) descreveram também a reconstituição da beta-globina de adulto, expressa em E. coli, e da alfa-globina de adulto obtida a partir de fontes convencionais, conjuntamente com uma fonte de heme, para obter a hemoglobina. Contudo, não foi possível produzir, em E. coli, hemoglobina recombinante com as mesmas propriedades funcionais da hemoglobina humana normal, devido a incapacidade da E. coli em remover a N-formilmetionina por processamento pós-tradução. É conhecido que o terminal amino é crítico na determinação das propriedades de ligação de oxigénio da hemoglo-

bina humana, tal como se tem mostrado no caso da Hb Raleigh (Moo-Penn, et al., 1977, Biochemistry, 16:4872-4879). Além disso, a hemoglobina produzida em bactérias pode conter endotoxinas de E. coli.

Têm, também, sido feitas várias tentativas para exprimir a hemoglobina em levedura. Relatórios de dois grupos indicam que as células de levedura foram incapazes de excisar as sequências intervenientes em ambos os ARN-m precursores de alfa-globina e de beta-globina (Langford et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1496-1500 e Beggs et al., 1980, Nature (London) 283:835-840). Fez-se também uma tentativa para segregar beta-globina em Streptomyces construindo um plasmídeo possuindo uma sequência Galk-FX-beta-globina atrás de uma sequência de sinal de secreção de beta-galactosidase (Brinigar et al., 1988, Symposium on Oxygen Binding Heme Proteins Structure, Dynamics, Function and Genetics). Contudo, a Galk-FX-beta-globina permaneceu nas células sob condições nas quais a galactoquinase foi segregada.

Recentemente, descreveu-se a construção de dois plasmídeos de levedura contendo a beta-globina de adulto (Brinigar et al., 1988, Symposium on Oxygen Binding Heme Proteins Structure, Dynamics, Function and Genetics). Um continha um promotor constitutivo, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e ubiquitina, fundidos directamente com beta-globina de adulto, e outro continha metalotioneína, um promotor indutível, e ubiquitina fundidos directamente com a beta-globina. Descreveu-se também que, em ambos os casos, se obtinham beta-globina de adulto intracelular, solúvel e insolúvel. Não se descrevem mais detalhes relativos à construção dos plasmídeos ou à quantidade de beta-globina de adulto obtida.

Foi também descrita a expressão de globina em células de mamíferos. Descreveu-se a construção de vectores recombinantes de vírus herpes simplex, adenovírus, SV-40 e retrovirus, contendo uma sequência de ADN codificando o gene da beta-globina de adulto humano (Dobson et al., 1989, J. Virol. 63:3844-3851; Yanagi et al., 1989, Gene 76:19-26; Miller et al., 1988, J. Virol. 62:4337-4345; e Karlsson et al., 1985, EMBO J 5: 2377-2386). Descreveu-se

também a expressão de genes de alfa-globina de adulto humano em células de ovário de hamster Chinês, que envolvia a introdução de uma molécula de ADN recombinante, contendo o gene de alfa-globina de adulto humano normal, e um gene híbrido contendo a região de promotor-regulador 5' do gene de metalotioneína de ratinho, ligada a um gene de SV2-ADNc-di-hidrofolato-redutase (Lau et al., 1984, Mol. Cell Biol. 4:1469-1475). Contudo, verificou-se que a expressão dos genes de globina era muito baixa devido à baixa eficiência da transferência do gene.

#### 2.1.2. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA HEMOGLOBINA

Uma abordagem que foi adoptada para tornear o problema da dissociação do tetramero de hemoglobina para formar um dímero, tem sido modificar quimicamente a hemoglobina, por reticulação, quer intramolecular quer intermolecular. Exemplos destas modificações incluem, reticulação com polialquilénoglicol (Iwashita, Patentes dos E.U.A. nºs. 4 412 989 e 4 301 144), com poli(óxido de alquilenos) (Iwasake, Patente dos E.U.A. nº. 4 670 417), com um polissacárido (Nicolau, Patentes dos E.U.A. nºs. 4 321 259 e 4 473 563); com fosfato de inositol (Wong, Patente dos E.U.A. nºs. 4 710 488 e 4 650 786); com um agente de reticulação bifuncional (Morris et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 061 736); com insulina (Ajisaka, Patente dos E.U.A. nº. 4 377 512); e com um agente de reticulação, de modo à composição de hemoglobina estar reticulada intramolecularmente entre a Lys 99- $\alpha_1$  e a Lys 99- $\alpha_2$  (Walder, Patente dos E.U.A. nº. 4 598 064).

Também se modificou quimicamente a hemoglobina para diminuir a afinidade por oxigénio da hemoglobina isolada. Uma abordagem envolveu a polimerização com peridoxal-fosfato (Sehgal et al., 1984, Surgery, 95:433-438). Outra abordagem envolveu o uso de reagentes que mimetizam, o 2,3-DPG (Bucci et al., Patente dos E.U.A. nº 4 584 130). Ainda que estes compostos diminuam a afinidade por oxigénio da hemoglobina, a afinidade é ainda relativamente elevada.

#### 2.1.3. VARIANTES DA HEMOGLOBINA

As categorias de variantes da hemoglobina de ocorrência na-

tural incluem: variantes que auto-polimerizam; variantes que evitam a dissociação do tetramero, variantes com afinidade intrínseca por oxigénio diminuída e variantes que são estáveis em meio alcalino. Exemplos de variantes da hemoglobina que polimerizam incluem a Hb Porto Alegre, a Hb Mississippi e a Hb Ta-Li.

A Hb Porto Alegre é uma variante de cadeia beta, primeiramente descrita, por Tondo et al. (1974, Biochem. Biophys. Acta 342: 15-20; 1963, Am. J. Human Genet. 15:265-279). A serina beta-9 está substituída por cisteína, que é capaz de formar ligações dissulfureto com outros resíduos cisteína. Através destas ligações cruzadas, a Hb Porto Alegre forma poli-tetrameros. Contudo, estes polímeros não se formam no sangue dos portadores de Hb Porto Alegre. Mostrou-se que os portadores de Hb Porto Alegre possuem um nível duas vezes mais elevado de glutathione e um nível três vezes mais elevado de glutathione-redutase que evita a polimerização da Hb Porto Alegre nos glóbulos vermelhos (Tondo et al., 1982, Biochem. Biophys. Res. Commun. 105:1381-1388). A estrutura exacta destes polímeros não é conhecida.

A Hb Mississippi é uma variante de polimerização da hemoglobina, recentemente isolada. A nova variante foi primeiramente descrita por Adams et al. (1987, Hemoglobin 11:435-452). A serina beta-44 está substituída por cisteína, nesta variante, resultando em ligações dissulfureto inter-tetramero. Crê-se que esta variante forma polímeros, contendo tanto quanto dez tetrameros.

A Hb Ta-Li é outra variante beta de polimerização, conhecida. A glicina beta-83 está substituída por cisteína. Esta variante foi primeiramente descrita em 1971 (Blackwell et al., 1971, Biochem. Biophys. Acta 243:467-474). Esta variante forma também ligações cruzadas inter-tetramero.

Outro grupo de variantes inclui variantes possuindo tetrameros que não se dissociam. Um exemplo é a Hb Rainier, uma variante bem caracterizada da cadeia beta (Greer e Perutz, 1971, Nature New Biology 230:261 e Statoyannopoulos et al., 1986, Science 159-741). A tirosina beta-145 está substituída por cisteína. Esta

cisteína é capaz de formar ligações cruzadas dissulfureto com a cisteína beta-93, que está presente na beta-globina natural. Esta ligação dissulfureto é intra-tetramero, *i.e.*, é formada entre as duas subunidades beta no tetramero. Esta ligação covalente de dissulfureto estabiliza a forma de tetramero e evita a dissociação do tetramero nos seus dímeros constituintes. Verificou-se, também, que a Hb Rainer possui uma afinidade elevada por oxigénio, um coeficiente de Hill reduzido e apenas metade do efeito de Bohr alcalino da hemoglobina normal.

Outro grupo de variantes inclui as que são estáveis em meios alcalinos. A Hb Motown/Hacettepe é uma variante descrita como sendo estável em meio alcalino (Gibb e Rucknagel, 1981, *Clinical Research* 29:795A e Altay et al., 1976, *Biochem. Biophys. Acta* 434:1-3). A glutamina beta-127 está substituída por ácido glutâmico nesta variante. Esta porção da cadeia beta está envolvida na interface  $\alpha_1\beta_1$  entre os monómeros que formam o dímero. O ácido glutâmico substituído forma uma ligação iónica com a arginina alfa-31. Esta é uma ligação mais forte do que a que se forma entre a arginina alfa-31 e a glutamina normal beta-127 e crê-se que é responsável pela maior estabilidade da Hb Motown/Hacettepe. Neste grupo de variantes, estáveis em meio alcalino, incluem-se também a HbF (hemoglobina fetal) e a hemoglobina de bovino (Perutz, 1974, *Nature* 247:341).

Existem, também, cerca de 30 variantes de hemoglobina de ocorrência natural que exibem uma afinidade por oxigénio diminuída. No Pedido PCT nº. PCT/US88/01534 (Publicação nº. WO 88/091799, publicada em 1 de Dezembro de 1988), Bonaventura e Bonaventura, 1980, em: *Abnormal Human Hemoglobins and Red Cell Enzymes*, Huisman, T., Ed., Marcel Dekker, NY, Hemoglobin 4 (3 & 4): 275-289 e Bonaventura e Bonaventura, 1978, em *Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities*, Caughey, W.S., Ed., Academic Press, NY, pp. 647-663, descrevem-se vários exemplos destas variantes. Parece que, num grupo destes mutantes de baixa afinidade por oxigénio, existe uma relação generalizável entre a afinidade por oxigénio intrínseca de uma hemoglobina  $\alpha_2\beta_2$  e o agregado de resíduos carregados positivamente que estão envol-

vidos na ligação de 2,3-DPG e de outros cofactores alostéricos aniónicos da função hemoglobina (Bonaventura e Bonaventura, 1980, Amer. Zool. 20:131-138).

Um exemplo de um mutante de baixa afinidade por oxigénio é a Hb Chico onde a lisina beta-66 está substituída por treonina (Shih et al., 1987, Hemoglobin 11: 453-464). A P50 dos glóbulos vermelhos de Hb Chico é de 38 mm Hg em comparação com os controlos de glóbulos vermelhos normais com P50 de 27 mm Hg. Todas as outras propriedades, i.e. coeficiente de Hill e efeito de Bohr alcalino são normais.

Outra variante com uma baixa afinidade por oxigénio é a Hb Raleigh, uma variante de cadeia beta na qual a valina beta-1 está substituída por alanina (Moo-Penn et al., 1977, Biochemistry 16:4873). Uma modificação pós-tradução da alanina amino-terminal resulta na formação de acetilalanina. Uma vez que o grupo amino da valina, carregado positivamente, está envolvido na ligação de 2,3-DPG, a acetilação resulta num agregado de menor carga no sítio de ligação de DPG. Esta diferença de carga actua para diminuir a afinidade por oxigénio da Hb Raleigh e para atenuar o efeito do DPG, o que diminui a afinidade por oxigénio da HbA normal. O coeficiente de Hill (cooperação) e o efeito de Bohr alcalino (ligação de oxigénio dependente do pH) não são afectados por esta modificação.

A Hb Titusville (aspartato alfa-94 para asparagina) é uma de um grupo de variantes de hemoglobina, de baixa afinidade, com contactos  $\alpha_1\beta_2$  alterados (Schneider et al., 1975, Biochem. Biophys. Acta 400:365). A interface  $\alpha_1\beta_2$  é estabilizada por dois conjuntos diferentes de ligações de hidrogénio entre as subunidades alfa e beta. Um dos conjuntos estabiliza a estrutura T que é a forma de baixa afinidade e o outro estabiliza o estado R que é a forma de afinidade elevada. É a interconversão entre estes dois conjuntos de ligações e a alternância entre os estados T e R que é responsável pela cooperação positiva. A desoxi-hemoglobina está, principalmente, no estado T. Para a hemoglobina com um oxigénio ligado, a quantidade de moléculas no estado R aumenta

e, deste modo, liga-se ao oxigénio com uma afinidade mais elevada. Na hemoglobina com dois oxigénios ligados, existe uma proporção ainda maior de moléculas no estado R. Na Hb Titusville, as ligações no estado R são quebradas. O aspartato alfa-94 formaria, normalmente, uma ligação não covalente com a asparagina beta-102. Devido ao facto de esta ligação ser quebrada, o equilíbrio é empurrado na direcção do estado T e a afinidade por oxigénio da Hb Titusville é muito baixa.

A Hb Beth Israel é outra variante que afecta a interface  $\alpha_1\beta_2$ , o que desestabiliza o estado R de elevada afinidade por oxigénio (Nagel et al., 1976, New Eng. J. Med. 295:125-130). A asparagina beta -102 está substituída por serina. O sangue completo de um paciente com Hb Beth Israel tem uma P50 de 88 mm Hg em comparação com o valor normal de 27. O coeficiente de Hill é bifásico com um valor de 1,0 na extremidade elevada e de 1,8 na extremidade baixa. O efeito de Bohr é normal. Um hemolisado de Hb Beth Israel tem uma P50 de 17 mm Hg e um coeficiente de Hill de 1,65 no fundo e de 1,29 no topo da curva, em comparação com uma P50 de 5,6 e com um coeficiente de Hill de 2,72 para a hemoglobina normal.

Outro exemplo de um mutante de hemoglobina humana de baixa afinidade é a Hb Kansas (Pedido PCT nº. PCT/US88/01534, Publicação nº. WO 88/091799, publicada em 1 de Dezembro de 1988 e Bonaventura e Riggs, 1968, J. Biol. Chem. 243: 980-991). A asparagina beta-102 está substituída por treonina. Mostrou-se que as cadeias de beta-globina contendo heme da Hb Kansas isolada têm uma afinidade por oxigénio diminuída (Riggs e Gibson, 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:1718-1720).

## 2.2. EXPRESSÃO DE ADN HETERÓLOGO EM LEVEDURA

Com o advento da tecnologia do ADN recombinante, têm sido desenvolvidos esforços para exprimir ADN heterólogo numa variedade de sistemas procarióticos e eucarióticos. A levedura é um destes sistemas.

A levedura tem um certo número de vantagens, em relação a

bactérias e a outros eucariotas, como sistema para a produção de polipéptidos ou de proteínas codificadas por ADN recombinante. A levedura tem sido usada em fermentações em grande escala durante séculos, de modo que a tecnologia de fermentação da levedura é bem conhecida e está disponível, comercialmente, um grande número de hospedeiros de levedura. Adicionalmente, a levedura pode ser cultivada até densidades mais elevadas do que as bactérias e do que muitos outros tipos de células eucarióticas, e é facilmente adaptável ao processamento de fermentação contínua. Uma vez que a levedura é um organismo eucariótico, a levedura pode ser capaz de glicosilar produtos de expressão, pode exibir as mesmas preferências de códon do que organismos superiores e pode remover a metionina do terminal amino durante o processamento pós-tradução.

Têm sido expressas em levedura numerosas proteínas heterólogas. Exemplos incluem o interferão (Hitzeman e Leung, Patente dos E.U.A. nº. 4 775 622, publicada em 4 de Outubro de 1988; Hitzman et al., Patente Canadiana nº. 1 205 026, publicada em 27 de Maio de 1986; Hitzeman et al., 1981, Nature (London) 293: 717); o factor de crescimento derivado de plaquetas (Murray et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 801 542, publicada em 31 de Janeiro de 1989); o glucagon (Norris et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 826 763, publicada em 2 de Maio de 1989).

As proteínas heterólogas expressas em levedura têm sido ligadas a uma grande variedade de promotores. Exemplos incluem a ligação operativa de proteínas heterólogas a promotores SV40 e RSV (Gelfand et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 8710 013, publicada em 26 de Setembro de 1989). Adicionalmente, têm-se ligado sequências de ADN, codificando proteínas heterólogas, a promotores de levedura que são indutíveis. A Publicação do Pedido de Patente Europeia nº. 132 309, publicada em 30 de Janeiro de 1985, descreve a construção de um plasmídeo contendo os promotores de levedura, induzidos por galactose, para a galactoquinase (GAL1) e para a UDP-galactose-epimerase (GAL10), aqui depois designado por promotor GAL1-10, que é bidireccional. Outro exemplo de um promotor de levedura bi-direccional é a sequência intergenes YPT1/TUB2 que contém sítios de ligação sobrepostos para o factor de transcrição

BAF1 (Halfter et al., 1989, EMBO J. 8:3029-3037). Broach et al. (Manipulation of Gene Expression, ed. Inouye, 1983) descrevem um plasmídeo contendo uma sequência de ativador a montante do GAL10, que promove a transcrição e uma sequência de terminador da transcrição da álcool-desidrogenase (ADH1), para evitar a continuação da transcrição, derivada de YEp51. Kingsman et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 615 974, publicada em 7 de Outubro de 1986, descrevem o uso das regiões 5' dos genes da fosfoglicerato-quinase de levedura como promotor da transcrição de interferão. Hintzeman et al., Patente Canadiana nº. 1 205 026, publicada em 27 de Maio de 1986 descreve o uso da sequência de flanqueamento 5' do gene estrutural da ADH1 para promover a transcrição do interferão. Burke et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 876 197, publicada em 24 de Outubro de 1989, descrevem uma construção de ADN compreendendo uma primeira região reguladora de transcrição, obtida a partir do gene da álcool-desidrogenase II (ADH2) de levedura, a região reguladora de ácido-fosfatase (PHO5) ou as regiões reguladas por GAL4, que proporciona uma regulação transcricional indutível, e uma segunda região de iniciação transcricional do gene da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (IDH3) de levedura e uma região de terminador.

### 3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a uma cadeia de globina de mamífero, substancialmente pura, ou a um seu fragmento de ligação a heme. "Substancialmente pura" tal como é aqui definida refere-se a uma cadeia de globina que está isenta de componentes de membrana de eritrocitos e de endotoxinas de E. coli. A cadeia de globina pode ser uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma sua variante, ou uma cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante. A cadeia do tipo alfa pode ser seleccionada de entre o grupo que inclui, mas não está limitado a, uma cadeia de zeta-globina de embrião e uma cadeia de alfa-globina de adulto. A cadeia do tipo beta pode ser seleccionada de entre o grupo que inclui, mas que não está limitado a, uma cadeia de epsilon-globina de embrião, uma cadeia de gama-globina fetal, uma cadeia de delta-globina de adulto e uma cadeia de beta-globina de adulto. A hemoglobina consistindo essencialmente de uma cadeia de globina do tipo alfa e de uma ca-

deia de globina do tipo beta pode ser obtida por mistura de uma globina do tipo alfa e de uma globina do tipo beta, ou das suas variantes, com uma fonte de heme. A hemoglobina consistindo essencialmente de cadeias de gama-globina, ou das suas variantes, pode ser obtida por mistura das cadeias de gama-globina, ou das suas variantes, com uma fonte de heme. A hemoglobina consistindo essencialmente de uma cadeia de globina de tipo alfa e de uma cadeia de globina do tipo beta, e a hemoglobina consistindo essencialmente de um cadeia de gama-globina, ou de uma sua variante, pode ser usada em aplicações que requerem transportadores de oxigénio fisiológico, tais como em soluções de substituição de sangue, ou em expansores de plasma.

As cadeias de globina ou os seus fragmentos de ligação a heme da presente invenção, podem ser obtidas por expressão de um vector de ADN recombinante compreendendo uma sequência de ADN codificando pelo menos uma cadeia de globina, ou um seu fragmento de ligação a heme, em levedura. Deste modo, a invenção refere-se a um vector de ADN recombinante, capaz de exprimir uma cadeia de globina, ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura compreendendo:

- (a) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina ou um seu fragmento de ligação a heme;
- (b) um promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina ou o seu fragmento de ligação a heme;
- (c) uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e
- (d) uma origem de replicação de levedura.

Um promotor transcricional de levedura pode ser seleccionado de entre o grupo que inclui, mas que não está limitado a, um promotor transcricional indutível de levedura, um promotor transcricional constitutivo de levedura, um promotor híbrido de levedura, e um promotor bi-direccional de levedura.

O vector de ADN recombinante pode ser capaz de exprimir uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma cadeia de globina do tipo

beta ou uma sua variante. Noutra concretização, o vector pode ser capaz de exprimir duas cadeias de globina. Numa concretização, o vector pode ser capaz de exprimir uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta, ou as suas variantes. Em concretizações específicas, o vector pode ser capaz de exprimir uma cadeia de globina do tipo alfa não variante e uma cadeia de globina do tipo beta variante; alternativamente, o vector recombinante pode ser capaz de exprimir uma cadeia de globina do tipo alfa variante e uma cadeia de globina do tipo beta não variante; ou o vector recombinante pode ser capaz de exprimir uma cadeia de globina do tipo alfa variante e uma cadeia de globina do tipo beta variante. Numa concretização muito específica, o vector recombinante pode ser capaz de exprimir uma cadeia de alfa-globina de adulto e uma cadeia de beta-globina de adulto.

A invenção refere-se a um processo para a produção de pelo menos uma cadeia de globina, ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura compreendendo:

(a) a introdução numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante compreendendo: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina ou uma sua porção funcionalmente activa; (iii) uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) a cultura da célula de levedura num meio apropriado, de modo a que a cadeia de globina ou um seu fragmento de ligação a heme seja expressa.

A invenção refere-se também a um processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta, compreendendo os passos de:

(a) a introdução numa célula de levedura de um vector de ADN recombinante compreendendo: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma sua variante; (ii) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo beta

ou uma sua variante; (iii) um promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina do tipo alfa e a cadeia de globina do tipo beta; (iv) uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma origem de replicação de levedura;

(b) a cultura da célula de levedura num meio apropriado de modo a que a cadeia de globina do tipo alfa ou o seu fragmento de ligação a heme e a cadeia de globina do tipo beta ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressas;

(c) o isolamento da cadeia de globina do tipo alfa e da cadeia de globina do tipo beta da célula de levedura; e

(d) a mistura da cadeia de globina do tipo alfa e da cadeia de globina do tipo beta com uma fonte de heme.

A invenção refere-se ainda a um processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta numa célula de levedura produzindo heme, compreendendo:

(a) a introdução numa célula de levedura de um vector de ADN recombinante, compreendendo: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma sua variante; (ii) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante; (iii) um promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina do tipo alfa e a cadeia de globina do tipo beta; (iv) uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma origem de replicação de levedura; e

(b) a cultura da célula de levedura num meio apropriado de modo a que a cadeia de globina do tipo alfa, ou a sua variante, e a cadeia de globina do tipo beta, ou a sua variante, sejam expressas e reunidas conjuntamente com heme numa célula de levedura produzindo heme, para formar hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta.

A invenção refere-se também a um processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina do tipo alfa, ou

uma sua variante, uma cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante, compreendendo os passos de:

(a) a introdução numa célula de levedura de dois vectores de ADN recombinante onde o primeiro vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma sua variante; (ii) um promotor transcripcional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina do tipo alfa, ou uma sua variante; (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura, e onde o segundo vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante; (ii) um promotor transcripcional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante; (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura;

(b) a cultura da célula de levedura de modo a que as cadeias de globina do tipo beta e do tipo alfa ou os seus fragmentos de ligação a heme sejam expressas;

(c) o isolamento das cadeias de globina do tipo alfa e do tipo beta da célula de levedura; e

(d) a combinação das cadeias de globina do tipo alfa e do tipo beta com uma fonte de heme.

A invenção refere-se também a um processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina do tipo alfa, ou uma sua variante e uma cadeia de globina do tipo beta, ou uma sua variante, numa célula de levedura produzindo heme, compreendendo os passos de:

(a) a introdução numa célula de levedura de dois vectores de ADN recombinante, onde o primeiro vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo alfa ou uma sua variante; (ii) um promotor transcripcional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina do tipo alfa, ou uma sua variante;

(iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura, e onde o segundo vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante; (ii) um promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina do tipo beta ou uma sua variante; (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura;

(b) a cultura da célula de levedura em meio apropriado de modo a que as cadeias de globina do tipo alfa e do tipo beta, ou as suas variantes, sejam expressas e reunidas conjuntamente com heme na célula de levedura para formar hemoglobina.

#### 4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra as sequências de nucleótidos das cadeias zeta de embrião (1A), epsilon de embrião (1B), gama fetal (1C), delta de adulto (1D), alfa de adulto (1E), e beta de adulto (1F) da hemoglobina humana. Mostram-se por baixo as sequências de aminoácidos deduzidas. O codão de início AUG e a metionina amino-terminal correspondente, que é removida por metionina-amino-peptidase numa modificação pós tradução não se mostram nas figuras.

A Figura 2 mostra um mapa de restrição parcial do plasmídeo pSPBC. Mostra-se a inserção completa do gene da beta-globina pela linha dupla e as sequências de plasmídeo são indicadas por uma linha simples. Os sítios de restrição que se mostram sobre a linha são A=AccI; E=EcoRI; F=SfaNI; H=HindIII; N=NcoI; e B=BamHI. A linha sobre os sítios de restrição representa a região de codificação do gene da beta-globina. Os números sob as linhas representam o comprimento em pares de bases a partir do sítio EcoRI presente no vector.

A Figura 3A mostra a estratégia usada para clonar o gene da beta-globina Porto Alegre na YEp51. A Figura 3B mostra a estratégia usada para clonar o gene da beta-globina de adulto na YEp51.

A Figura 4 mostra o mapa de restrição do plasmídeo YEpWB51/Port.

A Figura 5 mostra uma auto-radiografia do ARN total extraído da estirpe de levedura Sc340 transformada com YEp51 (340g2C), YEp51T/Nat (340g2B) e YEpWB51/Port (340g2P). Submeteu-se o ARN total a electroforese num gel de agarose a 1,1%, transferiu-se para papel Hybond e sondou-se com um fragmento ApaLI-HindIII (600 pb) do gene da beta globina do plasmídeo mp18bHS. Determinou-se o nível de um ARN de controlo (CYH2) com o plasmídeo mp19CYH22 (9,0kb) que transporta a região de codificação do gene (CYH2). Carregaram-se em cada faixa 20 µg do ARN total. A amostra em cada faixa é a seguinte: faixa 1: 340g2C; faixa 2: 340g2B e faixa 3: 340g2P. β marca o ARN-m da beta-globina. O ARN-m de CYH2 está marcado com C1 (forma precursora) e C2 (ARN-m maduro). Os números de lado indicam o comprimento em nucleótidos.

A Figura 6A mostra os resultados da pesquisa de uma auto-radiografia contendo o ARN-m de beta-globina e de CYH2 obtida de uma mancha Northern usando um analisador de gel LKB. O pico largo em A (340g2B) representa o ARN de beta-globina e os dois picos pequenos de ambos os lados do pico grande representam o ARN-m de CYH2. A Figura 6B mostra os resultados da pesquisa de uma auto-radiografia contendo o ARN-m de beta-globina de Porto Alegre e o ARN-m de CYH2, obtida de uma mancha Northern usando um analisador de gel LKB. O pico grande em B (340g2P) representa o ARN-m de beta-globina Porto Alegre e os dois picos pequenos em ambos os lados do pico grande representam o ARN-m de CYH2.

A Figura 7 mostra um mapa do mp18BHS.

A Figura 8 mostra um mapa do AAH5.

A Figura 9 mostra um mapa do L19BAt.

A Figura 10 mostra um mapa de restrição do plasmídeo pUC19-HBAt.

A Figura 11 mostra parte da sequência do promotor GAL1-10.

A Figura 12 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pUC19-GHBat.

A Figura 13 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pNML-VG--1.

A Figura 14 mostra o mapa de restrição do plasmídeo YEpWB51/Nat.

A Figura 15 mostra a estratégia para a clonagem do terminador ADH1 no YEpWB51/Nat.

A Figura 16 mostra o mapa de restrição do plasmídeo YEp51T/Nat.

A Figura 17 mostra a construção do YEp51T/G.

A Figura 18 mostra a sequência de ADN do gene da gama-globina.

A Figura 19 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes em GAM-5-S (iniciador da extremidade 5'), GAM-3H (iniciador da extremidade 3'). Estes iniciadores foram usados para sintetizar o ADN da gama-globina.

A Figura 20 mostra o mapa de restrição do plasmídeo YEp51T/G.

A Figura 21 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes no iniciador 5', 5TG-Apal e no iniciador 3', ADHSBS-3' usados para sintetizar o ADN da gama(val)-globina.

A Figura 22 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pNM-5-G--gama<sub>val</sub>1.

A Figura 23 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes nos iniciadores 51-A-1 e 519-A-3.

A Figura 24 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes nos iniciadores G10T-5B e G10T3ESS.

A Figura 25 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes nos iniciadores 5' e 3', usados para sintetizar as primeiras 36 bases do promotor híbrido da alfa-globina.

A Figura 26 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes nos iniciadores 5' e 3', usados para sintetizar o fragmento 3' do gene da alfa-globina.

A Figura 27 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pUC19-GHA.

A Figura 28 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pUC19-GHAGt.

A Figura 29 mostra as sequências e os sítios de restrição dos iniciadores usados para sintetizar o fragmento de ADN HAgT.

A Figura 30 mostra o mapa de restrição do pUC19-AHAGt.

A Figura 31 mostra o mapa de restrição do pPM40.

A Figura 32 mostra o mapa de restrição do pNM-R-A- $\alpha$ 1.

A Figura 33 mostra o mapa de restrição do plasmídeo pNM-R-G- $\alpha$ 1.

A Figura 34 mostra a estratégia usada para a clonagem da "cassette" GHAGt no vector de levedura contendo a "cassette" de expressão GHBA<sub>t</sub>.

A Figura 35 mostra as sequências e os sítios de restrição presentes nos iniciadores 5' e 3' usados para sintetizar a sequência de terminador de ADH1 no plasmídeo pUC19-ADHT.

A Figura 36 mostra a estratégia usada para a clonagem de

AH $\gamma$ <sub>val</sub>At no pNM-R-A- $\alpha$ 1.

A Figura 37 mostra as sequências e os sítios de restrição, presentes nos iniciadores 5' e 3' usados para sintetizar o fragmento de ADN ADH2-UAS.

A Figura 38 mostra o mapa do plasmídeo pUC19-ADH2-UAS.

A Figura 39 mostra as sequências e os sítios de restrição presentes nos iniciadores 5', 5TDH3-3X e o iniciador 3', ADH-t-SB.

A Figura 40 mostra o mapa do plasmídeo pUC19-AH $\gamma$ <sub>val</sub>At.

A Figura 41 mostra as sequências de Mu-145Cy, Mu-66Th e Mu-9Cy.

A Figura 42 mostra o mapa de restrição de YEp51NT1.

A Figura 43 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', BN-5-Sal e do iniciador da extremidade 3', B-B3-Tal.

A Figura 44 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', B-G127-5 e do iniciador da extremidade 3', Beta-3-H.

A Figura 45 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', A104S-5 e do iniciador da extremidade 3', G10T3H.

A Figura 46 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', G-5-9CY e do iniciador da extremidade 3', GAM-3-H.

A Figura 47 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', GAM-5-S e do iniciador da extremidade 3', G66T-3.

A Figura 48 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', G-5-9CY e do iniciador da extremidade 3', G66T-3.

A Figura 49 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', Z-5-SAL e do iniciador da extremidade 3', Z-A95-3.

A Figura 50 mostra as sequências e os sítios de restrição do iniciador da extremidade 5', Z-BST-5 e do iniciador da extremidade 3', Z-3-H.

A Figura 51 mostra as sequências e os sítios de restrição dos iniciadores 5' e 3' usados para sintetizar, por PCR, o gene da beta-globina Mississippi.

#### 5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O presente invento refere-se a uma cadeia de globina de mamífero substancialmente pura ou a um seu fragmento de ligação a heme. Num aspecto preferido, a invenção refere-se a uma cadeia de globina humana substancialmente pura ou a um seu fragmento de ligação a heme. A cadeia de globina pode ser uma cadeia de globina do tipo alfa, ou uma sua variante, ou uma cadeia de globina do tipo beta, ou uma sua variante. A cadeia de globina do tipo alfa pode ser seleccionada de entre o grupo incluindo, mas não limitado a, uma cadeia de zeta-globina de embrião e uma cadeia de alfa-globina de adulto. A cadeia de globina do tipo beta pode ser seleccionada de entre o grupo incluindo, mas não limitado a, uma cadeia de epsilon-globina de embrião, uma cadeia de gama-globina fetal, uma cadeia de delta-globina de adulto e uma cadeia de beta-globina de adulto. Podem-se misturar a globina do tipo alfa e a globina do tipo beta com uma fonte de heme, para obter hemoglobina compreendendo a globina do tipo alfa e a globina do tipo beta. A gama-globina pode ser misturada com uma fonte de heme para se obter hemoglobina compreendendo gama-globina. A hemoglobina produzida pelos processos do presente invento pode ser usada em aplicações requerendo transportadores de oxigénio fisiológico, tais como em soluções de substituição de sangue ou em expansores

de plasma.

A invenção refere-se também a vectores recombinantes capazes de exprimir uma cadeia de globina ou um seu fragmento de ligação a heme, em levedura. O vector recombinante pode ser capaz de exprimir duas cadeias de globina ou os seus fragmentos de ligação a heme. As cadeias de globina, numa concretização específica, compreendem uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta, ou as suas variantes. A invenção refere-se também a processos para a expressão em levedura de, pelo menos, uma cadeia de globina. As cadeias de alfa-globina e de beta-globina expressas, ou as suas variantes, podem ser combinadas com uma fonte de heme para produzir hemoglobina ou uma sua variante. A invenção refere-se, também, a processos para a expressão de hemoglobina em levedura nos quais o heme, que é produzido pela levedura ou que é obtido a partir de uma fonte exógena, está ligado à globina para formar hemoglobinas funcionais in vivo.

#### 5.1. ISOLAMENTO E CLONAGEM DA GLOBINA

Nas Figuras 1A-F ilustram-se, respectivamente, a sequência de nucleótidos dos genes codificando as cadeias de zeta-globina de embrião humano, de epsilon-globina de embrião humano, de gama-globina de feto humano, de delta-globina de adulto humano, de alfa-globina de adulto humano e de beta-globina de adulto humano, e as suas sequências de aminoácidos derivadas. Estas incluem, mas não estão limitadas a, sequências de nucleótidos compreendendo toda ou porções da sequência de nucleótidos, ilustrada nas Figuras 1A-F, que são alteradas pela substituição de diferentes códiões, que codificam o mesmo resíduo aminoácido ou um resíduo aminoácido funcionalmente equivalente, produzindo assim uma modificação muda, bem como sequências de aminoácidos compreendendo toda ou porções das sequências de aminoácidos ilustradas nas Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E ou 1F que são alteradas pela substituição de resíduos aminoácidos, funcionalmente equivalentes na sequência, produzindo assim uma modificação muda, e seus derivados que são modificados ou processados.

Os genes codificando as cadeias de globina do tipo alfa e de



globina do tipo beta podem ser isolados a partir de células contendo hemoglobina usando procedimentos conhecidos na arte. O ADN codificando globina do tipo alfa e/ou globina do tipo beta pode ser obtido por procedimentos convencionais conhecidos na arte, a partir de ADN clonado (p.e. uma "biblioteca" de ADN), por síntese química, por clonagem de ADN-c ou por clonagem de ADN genómico, ou dos seus fragmentos, purificado, por exemplo, a partir de reticulócitos humanos (ver, por exemplo, Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). O ADN codificando globina do tipo alfa ou do tipo beta pode ser também obtido usando a tecnologia de reacção em cadeia com polimerase (PCR) (ver, por exemplo, MULLIS et al., Patente dos E.U.A. nº. 4 800 159, 1989). Os clones derivados do ADN genómico podem conter regiões reguladoras e regiões de ADN de intrão, para além das regiões de codificação; os clones derivados de ADN-c conterão apenas sequências de exão. Seja qual for a fonte, o gene de globina deverá ser clonado molecularmente num vector adequado para a propagação do gene.

Na clonagem molecular do gene a partir de ADN genómico, geram-se fragmentos de ADN, alguns dos quais codificarão o gene de globina desejado. O ADN pode ser clivado em sítios específicos usando várias enzimas de restrição. Alternativamente, pode-se usar ADN-ase na presença de manganês, para fragmentar o ADN, ou o ADN pode ser fisicamente quebrado, por exemplo, por sonicação. Os fragmentos de ADN lineares podem depois ser separados de acordo com o tamanho, por técnicas convencionais, que incluem, mas que não estão limitadas a, electroforese em agarose e gel de poliacrilamida e cromatografia em coluna.

Após se terem gerado os fragmentos de ADN, a identificação do fragmento de ADN específico contendo a globina, pode ser realizada de um certo número de formas. Por exemplo, se está disponível e se se puder purificar e marcar uma quantidade de um gene de globina ou o seu ARN específico, ou um seu fragmento, os fragmentos de ADN gerados podem ser pesquisados por hibridação de ácido nucleico com a sonda marcada (Benton e Davis, 1977, Science 196:180 e Grunstein e Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 72:3961). Os fragmentos de ADN com homologia substancial com a sonda, hibridar-se-ão. Se não está disponível uma sonda, específica de globina, purificada, podem-se usar como sonda fracções de ácido nucleico enriquecidas em sequências de globina, como procedimento de selecção inicial. É também possível identificar o fragmento apropriado por digestão com enzimas de restrição e comparação dos tamanhos dos fragmentos com os tamanhos esperados de acordo com o mapa de restrição conhecido, se este estiver disponível. Após a selecção inicial pode-se proceder a uma selecção adicional com base nas propriedades do gene ou com base nas propriedades físicas ou químicas do seu produto de expressão, como se descreve infra.

O gene da globina pode ser também identificado por selecção de ARN-m por hibridação de ácido nucleico, seguida de uma tradução in vitro. Neste procedimento usam-se os fragmentos para isolar os ARN-m complementares, por hibridação. Os produtos de tradução in vitro dos ARN-m isolados identificam o ARN-m e, deste modo, os fragmentos de ADN complementares que contêm as sequências de globina.

Alternativas ao isolamento do ADN genómico da globina incluem, mas não estão limitadas a, síntese química da própria sequência do gene a partir da sequência conhecida ou preparação de ADN-c do ARN-m que codifica o gene da globina.

O gene ou o ADN-c identificados ou isolados podem ser depois inseridos num vector de clonação apropriado. Podem-se usar um grande número de sistemas vector-hospedeiro conhecidos na arte. Vectores possíveis incluem, mas não estão limitados a cosmídeos, plasmídeos ou vírus modificados, mas o sistema de vector tem de ser compatível com a célula do hospedeiro usado. Estes vectores incluem, mas não estão limitados a bacteriófagos, tais como derivados lambda, ou plasmídeos, tais como pBR322, pUC ou pGEM1<sup>®</sup> ou derivados de plasmídeo Bluescript<sup>®</sup>. As moléculas recombinantes podem ser introduzidas nas células de hospedeiro via transformação, transfecção, infecção, electroporação, etc..

Numa concretização alternativa, o gene pode ser identificado e isolado após inserção num vector de clonação adequado, de um modo do tipo "shot gun". O enriquecimento no gene de globina, por exemplo, por fraccionamento ou sub-fraccionamento de tamanhos do ADN-c, pode ser realizado antes da inserção no vector de clonação.

O gene de globina é inserido num vector de clonação que pode ser usado para transformar ou infectar as células do hospedeiro apropriado de modo que se geram muitas cópias das sequências do gene. Isto pode ser realizado ligando o fragmento de ADN num vector de clonação que possui terminais coesos complementares. Contudo, se os sítios de restrição complementares usados para fragmentar o ADN, não estão presentes no vector de clonação, as extremidades das moléculas de ADN podem ser modificadas enzimaticamente. Alternativamente, pode-se produzir qualquer sítio desejado, ligando sequências de nucleótidos (ligadores) nas extremidades do ADN; estes ligadores ligados podem compreender oligonucleótidos, sintetizados quimicamente, específicos, codificando sequências de reconhecimento de endonuclease de restrição. Num processo alternativo, o vector clivado e o gene de globina podem ser modificados por propagação homopolimérica.

Em concretizações específicas, a transformação das células de hospedeiro com moléculas de ADN recombinante, que incorporam um gene de globina isolado, ADN-c ou uma sequência de ADN sintetizado, permite a geração de múltiplas cópias do gene. Assim, pode-se obter o gene em grandes quantidades, por cultura de transformantes, isolamento das moléculas de ADN recombinante dos transformantes e, quando necessário, recuperação do gene inserido a partir do ADN recombinante isolado.

Depois do clone contendo globina ter sido identificado, cultivado e colhido, a sua inserção de ADN pode ser caracterizada usando procedimentos conhecidos na arte. O ADN clonado ou o ADN-c correspondente ao gene de globina podem ser analisados por métodos que incluem mas não estão limitados a, hibridação Southern (Southern, 1975,, J. Mol. Biol. 98:503-517), estabelecimento de mapas de endonucleases de restrição (Maniatis et al., 1989, Mole-

cular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), e análise da sequência de ADN. A análise da sequência de ADN pode ser realizada por qualquer das técnicas conhecidas na arte, que incluem, mas não estão limitadas a, métodos químicos (Maxam e Gilbert, 1980, Meth. Enzymol. 65:499-560), métodos enzimáticos (ver, p.e. Innes, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:9436, Tabor e Richardson, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:4767; e Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463), ou usando um sequenciador de ADN automático (ver, por exemplo Martin et al., 1985, Biotechnology 3:911-915).

## 5.2. VARIANTES DA GLOBINA

A produção e o uso de variantes de globina estão também previstas e incluídas no âmbito do presente invento. O termo "variante de globina", tal como é aqui definido, refere-se a uma globina cuja sequência de nucleótidos foi alterada, resultando deste modo numa alteração da estrutura ou da função da globina, mas de modo a que a globina permaneça ainda funcionalmente activa tal como é definido pela capacidade de ligar o oxigénio de um modo reversível. A variante pode ser de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. A invenção refere-se às categorias de variantes de hemoglobina seguintes: variantes que autopolimerizam; variantes nas quais o tetramero não se dissocia sob condições fisiológicas in vivo; variantes com uma afinidade por oxigénio intrínseca diminuída i.e. uma afinidade por oxigénio possuindo uma P50 de, pelo menos, cerca de 10 mm Hg sob condições fisiológicas; e variantes que são estáveis em meio alcalino. Numa concretização específica podem resultar poli-globina do tipo alfa ou poli-globina do tipo beta.

Tal como se discutiu na secção 2.1.3. supra, as variantes de globina que autopolimerizam incluem, mas não estão limitados a, beta-globina Porto Alegre ou Hb Porto Alegre (a serina beta-9 está substituída por cisteína), Hb Mississippi (a serina beta-44 está substituída por cisteína), ou Hb Ta-Li (a glicina beta-83 está substituída por cisteína).

Tal como também se descreve na secção 2.1.3, supra, um exemplo de variante na qual o tetramero não se dissocia inclui, mas não está limitado a, Hb Rainier (a tirosina beta-145 está substituída por cisteína) e a HbF<sub>Val</sub> (a glicina gama-1 está substituída por valina).

As variantes de hemoglobina estáveis em meio alcalino são aquelas em que o dímero não se dissocia em monómeros, em meio alcalino. O exemplo é a Motown/Hacettepe (a glutamina beta-127 está substituída por ácido glutâmico). Outro exemplo é uma variante na qual a serina substitui a cisteína alfa-104 (Perutz, 1974, Nature 247:371).

Exemplos de variantes com uma afinidade por oxigénio diminuída incluem, mas não estão limitados a, HbA Chico (a lisina beta-66 está substituída por treonina); HbF Chico (a lisina gama-66 está substituída por treonina); HbA Titusville (o asparpato alfa-94 está substituído por asparagina); a HB Portland Titusville (o aspartato zeta-94 está substituído por asparagina) HbF Beth Israel (a asparagina gama-102 está substituída por serina); e a HbF Kansas (a asparagina gama-102 está substituída por treonina).

Numa concretização específica, a variante de globina é substancialmente homóloga com uma cadeia de beta-globina de adulto e a variante compreende uma cisteína na posição beta-9. Numa concretização muito específica, a variante de globina é substancialmente homóloga com a beta-globina Porto Alegre e a variante compreende uma cisteína na posição beta-9. O termo "substancialmente homóloga", tal como é aqui utilizado, refere-se à capacidade de uma sequência de ADN codificando uma primeira cadeia de globina em se hibridar com uma sequência de ADN codificando uma segunda cadeia de globina sob condições rigorosas, por exemplo, a cerca de 0,1X SSC a uma temperatura de cerca de 65°C. Por exemplo, se uma variante de globina é substancialmente homóloga com uma cadeia de beta-globina de adulto, a sequência de ADN, codificando a variante de globina, é capaz de se hibridar com uma sequência de ADN, codificando a cadeia de beta-globina de adulto, sob condições rigorosas.

As variantes de globina podem ser produzidas por vários processos conhecidos na arte. As manipulações que resultam na sua produção podem ocorrer quer ao nível do gene quer ao nível da proteína. A globina pode ser alterada a nível do gene, por mutagénese específica de sítios, usando procedimentos conhecidos na arte. Uma abordagem que pode ser usada envolve o uso de oligonucleótidos sintéticos, para construir globinas variantes com substituições de bases. Numa concretização, sintetiza-se um oligonucleótido curto, contendo a mutação, e "tempera-se" ("anneal") com a forma de cadeia simples do gene de globina do tipo selvagem (Zoller e Smith, 1984, DNA 3:479-488). O heteroduplex curto, resultante, pode servir como iniciador para a síntese da segunda cadeia, por ADN polimerase. Na extremidade 5' forma-se um pequeno fragmento de cadeia simples que é fechado com ADN-ligase. Noutra concretização, sintetizam-se dois oligonucleótidos complementares contendo, cada um, a sequência mutante. O duplex, que se forma após a "têmpera" destes oligonucleótidos complementares, pode ser unido a uma molécula de ADN maior, usando ADN-ligase, desde que as extremidades de ambas as moléculas possuam extremidades de cadeia simples complementares "pegajosas". Outra abordagem, que pode ser adoptada, envolve a introdução de um pequeno intervalo de cadeia simples na molécula de ADN, seguida da síntese de ADN mal reparada, i.e. incorporação mal efectuada de um nucleótido não complementar no intervalo (Botstein e Shortle, 1985, Science 229:1193). A incorporação de um nucleótido de tiol no intervalo pode minimizar a excisão do nucleótido não complementar. Alternativamente, pode-se preparar uma variante de globina por síntese química do ADN, codificando a variante de globina, usando procedimentos conhecidos na arte (ver, por exemplo, Froehler, 1986, Nucl. Acids Res. 14:5399-5407 e Caruthers et al., 1982, Genetic Engineering, J.K. Setlow e A. Hollaender eds., Plenum Press, New York, vol. 4, pp. 1-17). Numa concretização preferida, sintetizam-se, quimicamente, os fragmentos da globina variante e ligam-se, subsequentemente, estes fragmentos. As cadeias de globina variante, resultantes, podem ser amplificadas, usando procedimentos conhecidos na arte, p.e., tecnologia PCR, e subsequentemente inseridas num vector de clonação como se descreve na secção 5.1., supra. Numa concretização específica

podem criar-se mutantes específicos de sítios, por introdução de erros nos oligonucleótidos usados para iniciar a amplificação por PCR (Jones e Howard, 1990, Biotechniques 8:178-180).

As manipulações da sequência de globina podem ser realizadas ao nível da proteína. Podem-se realizar quaisquer modificações químicas por técnicas conhecidas, que incluem, mas não estão limitadas a, clivagem química específica por brometo de cianogénio, tripsina, quimotripsina, papaina, protease V8,  $\text{NaBH}_4$ ; acetilação, formilação, oxidação, redução; etc.. Alternativamente, a proteína de globina variante pode ser sintetizada quimicamente, usando procedimentos conhecidos na arte, tais como sintetizadores de péptido, comercialmente disponíveis, e similares. Estas técnicas convencionais de síntese de polipéptidos estão descritas em publicações tais como Merrifield, 1963, J. Chem. Soc. 85:2149-2154 e Hunkapillar et al., 1984, Nature (London) 310:105-111).

### 5.3. EXPRESSÃO DA HEMOGLOBINA

A sequência de nucleótidos codificando uma cadeia de globina é inserida num vector de expressão apropriado, i.e., um vector que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência inserida, codificando a proteína. Pode-se utilizar uma variedade de sistemas de hospedeiro-vector, para exprimir a sequência de ADN codificando a cadeia de globina. Estes incluem, mas não estão limitados a, sistemas de células de mamífero infectadas com vírus (p.e. vírus da vacína, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas com vírus (p.e., baculovirus); levedura contendo vectores de levedura e bactérias transformadas com ADN de plasmídeo, ADN de cosmídeo ou ADN de bacteriófago. Num aspecto preferido, a célula de hospedeiro é uma célula de levedura.

#### 5.3.1. EXPRESSÃO DA HEMOGLOBINA EM LEVEDURA

Quando se exprimem cadeias de globina em levedura, têm porém de ser tidas em conta considerações especiais. São necessários sinais de regulação da expressão de sequências codificando cadeias de globina, em levedura, diferentes dos que se usam quando se exprimem estas sequências em sistemas procarióticos ou em sis-

temas de mamífero. Por exemplo, é necessária uma origem de replicação de levedura, num vector de ADN recombinante, capaz de exprimir uma sequência de globina de modo a verificar-se a replicação deste vector e, assim, uma expressão significativa. A sequência de nucleótidos codificando a cadeia do tipo alfa e/ou do tipo beta de globina, é inserida num vector que pode ser expresso em levedura. Numa concretização, uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina, ou uma sua variante, é inserida no vector de ADN recombinante. Noutra concretização, uma sequência de ADN codificando duas cadeias de globina, ou as suas variantes, pode ser inserida no vector de ADN recombinante. Ainda numa outra concretização, as duas sequências de ADN, codificando, cada uma, uma cadeia de globina, ou uma sua variante, são inseridas no vector de ADN recombinante. Numa concretização específica, uma sequência de ADN codifica uma cadeia de globina do tipo alfa, ou uma sua variante, e a segunda sequência de ADN codifica uma cadeia de globina do tipo beta, ou uma sua variante.

Numa concretização adicional, a célula de levedura é um membro da espécie Saccharomyces cerevisiae. Este vector compreende, para além da sequência de ADN codificando a globina: (a) um promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina; (b) uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura, ou uma sua porção funcionalmente activa; e (c) uma origem de replicação de levedura.

O primeiro componente do vector, um promotor transcricional de levedura, compreende dois componentes: (a) uma região reguladora transcricional que contém uma região distal do gene estrutural, ou sequência activadora, que proporciona a transcrição regulada (indutível) ou constitutiva; e (b) a região de iniciação transcricional, que inclui o sítio de iniciação da transcrição, a sequência "TATA", a sequência de invólucro, conforme apropriado, e uma sequência de ligação a ARN-polímerase, que inclui nucleótidos a montante do sítio de iniciação, para dirigir o início da síntese do ARN mensageiro. Numa concretização preferida, a sequência activadora é uma sequência activadora a montante. A

região reguladora transcricional terá, preferivelmente, pelo menos, 100 pares de bases (pb) e não excederá 3000 pares de bases. A região reguladora pode começar a uma distância de, pelo menos, cerca de 200 pb do codão de iniciação, usualmente, a uma distância de, pelo menos, cerca de 300 pb e pode iniciar-se a 400 pb, ou mais, a montante do codão de iniciação. A região de iniciação transcricional conterà, pelo menos, cerca de 150 pb, mais usualmente, pelo menos cerca de 200 pb, usualmente, não mais do que cerca de 600 pb, e, preferivelmente, cerca de 400 pb. A sequência pode estender-se na direcção a jusante da transcrição, com cerca de -10 pb a cerca de -25 pb (em relação à iniciação da transcrição a +1).

Numa concretização, o promotor transcricional de levedura é um promotor indutível. Os promotores indutíveis podem ser unidireccionais ou bidireccionais. Numa concretização preferida, os promotores indutíveis unidireccionais estão localizados a montante da sequência de ADN codificando a cadeia de globina. Os promotores indutíveis unidireccionais podem incluir, mas não estão limitados a, promotores que são regulados pela galactose (p.e., UDP-galactose-epimerase (GAL10), galactoqueinase (GAL1)), glucose (p.e., álcool desidrogenase II (ADH2)), e fosfato (p.e. ácido fosfatase (PH05)). Noutra concretização, o promotor indutível pode ser um promotor bidireccional. Um promotor bidireccional pode estar localizado a montante (5' do codão de início ATG) da sequência de ADN codificando uma cadeia de globina, na cadeia mais, numa das suas extremidades, e a montante da sequência de ADN codificando uma cadeia de globina, na cadeia menos, na sua outra extremidade; e deste modo controla a transcrição de ambas. Numa concretização específica, este promotor bidireccional é o GAL1-10.

O promotor pode também ser um promotor constitutivo. Numa concretização específica, o promotor constitutivo é um promotor da transcrição de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase III (IDH3) e é aqui depois designado por promotor IDH3. Outros promotores constitutivos incluem, mas não estão limitados a, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase II (IDH2), gliceraldeído-3-fosfato-

-desidrogenase I (IDH1), álcool-desidrogenase I (ADH1), fosfoglicerato-quinase (PGK), piruvato-quinase (PYK), enolase (ENO) e triose-fosfato-isomerase (TPI). Estas sequências promotoras conterão, pelo menos, cerca de 200 pb e não excederão cerca de 5 000 pares de bases.

Numa outra concretização, o promotor pode ser um promotor híbrido, no qual a sequência contendo a região reguladora transcricional é obtida de uma fonte, e a sequência contendo a região de iniciação da transcrição é obtida de uma segunda fonte. Numa concretização, a sequência contendo a região reguladora transcricional é uma sequência activante, a montante de um promotor indutível de levedura. O promotor indutível pode ser um promotor unidireccional ou um promotor bidireccional. A sequência contendo a região de iniciação transcricional pode ser obtida a partir da região de iniciação transcricional de um promotor constitutivo. Numa concretização específica, o promotor híbrido compreende uma região reguladora transcricional que é a sequência de activação a montante do promotor GAL10 e uma região de iniciação de transcrição que contém a região de iniciação de transcrição do promotor IDH3. Noutra concretização específica, o promotor híbrido pode regular a expressão de duas sequências de ADN separadas, em orientações opostas, se o promotor híbrido compreender uma sequência activante, a montante, com sítios de iniciação da transcrição localizados em ambos os lados, formando deste modo um promotor bidireccional. Numa concretização muito específica, uma sequência activante a montante, GAL-10 pode estar flanqueada em ambos os lados pela região de iniciação do promotor IDH3. O ADN codificando uma cadeia de globina está localizado a jusante de cada sequência IDH3. Noutra concretização, a UAS de ADH2 pode ser usada em vez da UAS de GAL1-10. Ainda noutras concretizações, a região de iniciação transcricional do promotor IDH3 pode ser substituída por IDH1, IDH2, PGK, ENO, TPI, CYC1, ou PYK.

Outro componente do vector de ADN recombinante é uma sequência codificando um marcador seleccionável de levedura. Numa concretização, o vector de ADN recombinante pode conter mais do que uma destas sequências. O marcador seleccionável de levedura

proporciona a pressão selectiva para a sobrevivência das células de levedura que exprimem o marcador. Num aspecto preferido, o marcador seleccionável complementa um defeito genético na estirpe hospedeira. Por exemplo, pode-se usar o URA3 como marcador seleccionável numa estirpe de levedura que é deficiente no produto do gene URA3. Estas sequências podem incluir, mas não estão limitadas a gene LEU2, gene URA3, gene HIS3, gene LYS2, gene HIS4, gene ADE8, gene CUP1, e gene TRP1. Outro exemplo, de uma tal sequência, inclui o gene leu2d que é um gene LEU2 deficiente em promotor. Numa concretização preferida, o gene leu2d é inserido num vector de ADN recombinante de cópias múltiplas. Uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene LEU2 ou leu2d pode ser cultivada em meio isento de leucina; uma célula transformada por um vector compreendendo o gene URA3 pode ser cultivada em meio isento de uracilo; uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene LYS3, pode ser cultivado em meio isento de lisina; uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene HIS3 pode ser cultivada em meio isento de histidina; uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene ADE8 pode ser cultivada em meio isento de adenina; uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene HIS4 pode ser cultivada em meio isento de histidina; uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene CUP1 pode ser cultivada em meio, contendo níveis de cobre inibidores da estirpe hospedeira sem o plasmídeo; e uma célula de levedura transformada por um vector compreendendo o gene TRP1 pode ser cultivada em meio isento triptofano. O vector de ADN recombinante pode também compreender uma sequência de ADN codificando uma porção funcionalmente activa de um marcador seleccionável de levedura. O termo "porção funcionalmente activa", tal como é aqui definido, é uma porção da sequência que codifica uma porção do marcador, que proporciona uma quantidade eficaz de pressão selectiva para a sobrevivência de células de levedura, que exprimem a porção do marcador.

O vector recombinante compreende, também, uma origem de replicação de levedura, ou uma porção funcionalmente activa da



origem de replicação que efectua a replicação do vector. Pode ser usada qualquer origem de replicação útil em levedura, que proporcione a replicação e a manutenção eficientes (ver, por exemplo, Kingsman e Kingsman, Patente dos E.U.A. nº. 4 615 974, publicada em 7 de Outubro de 1986). Exemplos destas origens de replicação incluem, mas não estão limitados a um sistema de replicação de plasmídeo 2 $\mu$ , ou uma sua porção funcionalmente activa, e sequências de replicação autónomas (ARS). Exemplos de ARS incluem, mas não estão limitados a ARS1 ou ARS3. As origens de replicação podem ser de número de cópia elevado ou baixo, dependendo do efeito da construção na viabilidade do hospedeiro. O vector pode compreender ainda sequências centroméricas (CEN), que podem proporcionar estabilidade meiótica e mitótica. Exemplos de sequências CEN incluem, mas não estão limitadas a CEN3, CEN4 e CEN11.

O vector de expressão pode compreender ainda, mas nem sempre requer, uma sequência de terminação da transcrição. Uma sequência de terminação da transcrição pode incluir os sinais de transcrição necessários para terminação e poliadenilação e pode ser obtida a partir de qualquer sequência de levedura. Numa concretização específica, a sequência de terminação da transcrição é a sequência de terminação da álcool-desidrogenase I (ADH1). Outras sequências de terminação, adequadas para uso na invenção, incluem, mas não estão limitadas a sequências de terminação do iso-1-citocromo c (CYC1), da UDP-glucose-4-epimerase (GAL10), da fosfoglicerato-quinase (PGK), ácido-fosfatase (PHO5), da enolase (ENO) e da triose-fosfato-isomerase (TPI). A sequência de terminação da transcrição tem, pelo menos, cerca de 100 pb e não deverá exceder cerca de 1 500 pb. Numa concretização preferida, a sequência de terminação da transcrição tem entre cerca de 150 pb e cerca de 1 200 pb.

Os vectores de expressão do presente invento podem ser construídos usando procedimentos de ADN recombinante, conhecidos na arte. Estes procedimentos estão descritos em detalhe na Secção 5.1., supra. Na Secção 7 descrevem-se exemplos específicos de vectores de expressão em levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando a beta-globina de adulto, sob o con-

trolo do promotor híbrido contendo o promotor GAL1-10 e o promotor IDH3. Na Secção 6 descreve-se um exemplo específico de um vector de expressão em levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando a cadeia de beta-globina Porto Alegre, sob o controlo do promotor indutível GAL10. Nas Secções 10 e 11 descreve-se um exemplo específico de um vector de expressão em levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando a cadeia de alfa-globina de adulto sob o controlo de um promotor híbrido. Na Secção 8 descreve-se o exemplo específico de um vector de expressão em levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando a cadeia de gama-globina sob o controlo do promotor indutível GAL10. Na Secção 9 descreve-se o exemplo específico de um vector de levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando uma variante da cadeia de gama-globina. Na Secção 16 descrevem-se exemplos específicos de outras variantes de globina. Nas Secções 13 e 15 descrevem-se exemplos específicos de um vector de expressão em levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta. Na Secção 14, descreve-se um exemplo específico de um vector de expressão de levedura e a sua construção, compreendendo sequências codificando a cadeia de zeta-globina sob o controlo de um promotor híbrido. Nas Secções 12, 17, 18 e 19, descrevem-se exemplos específicos da expressão de hemoglobina por co-expressão de plasmídeos compreendendo sequências codificando globina do tipo alfa e do tipo beta.

Os vectores de expressão do presente invento podem ser propagados em levedura, usando procedimentos conhecidos na arte. Os vectores de expressão podem ser propagados em levedura que pode ser, ou não, capaz de produzir heme. A levedura pode ser transformada com um ou mais vectores de expressão, usando procedimentos conhecidos na arte (p.e., o método do esferoplasto, (Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:1929-1933) ou o método do acetato de lítio (Ito et al., 1983, J. Bact. 153:163-168)). Os transformantes podem ser seleccionados pela presença da função do gene marcador (seleccionável) no transformante. Por exemplo, uma célula de levedura leu2 transformada com um vector

de expressão compreendendo um gene marcador LEU2, é seleccionada em virtude da sua capacidade em ser cultivada em meios isentos de leucina. As células de levedura transformadas podem ser cultivadas em meios compreendendo uma fonte de azoto e uma fonte de carbono, bem como as vitaminas, os minerais e os elementos vestigiários, essenciais (Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:1929-1933). Se o vector compreende um promotor indutível os meios deverão conter também o indutor.

Se o vector de expressão compreende sequências de ADN codificando uma cadeia de globina do tipo alfa e uma cadeia de globina do tipo beta, ou uma cadeia de globina do tipo beta (p.e., cadeia de gama-globina), pode-se exprimir hemoglobina na célula de levedura transformada com o vector. Numa concretização, o heme é produzido pela levedura e ligado à globina para formar hemoglobinas funcionais in vivo. Noutra concretização, as células de levedura podem ser deficientes em componentes requeridos para a produção de heme, por exemplo, o ácido 5-aminolevulínico. A hemoglobina pode ainda ser expressa numa tal célula se se adicionar o componente requerido.

O produto de proteína do gene de globina expresso, pode ser isolado e purificado usando métodos convencionais que incluem, mas não estão limitados a cromatografia (p.e., cromatografia em coluna de permuta iónica, de afinidade e de exclusão de tamanhos), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica convencional para a purificação de proteínas. Se se exprime uma cadeia de globina, a cadeia de globina expressa pode ser combinada com outra cadeia de globina e com uma fonte de heme para formar hemoglobina. Se se exprime hemoglobina na célula de levedura não são necessários passos adicionais.

Podem-se analisar o gene expresso e o seu produto, a nível genómico ou ao nível da proteína, usando procedimentos conhecidos na arte. Por exemplo, a expressão do gene de hemoglobina pode ser analisada por hibridação Southern ou Northern. A proteína de hemoglobina expressa pode, por exemplo, ser analisada por procedimentos de mancha Western, conhecidos na arte, e que também aqui

se descrevem na Secção 6.6. infra.

#### 5.4. USOS PARA AS HEMOGLOBINAS RECOMBINANTES EXPRESSAS

Usando os processos do presente invento pode-se obter hemoglobina em grande quantidade e com uma pureza elevada. Exemplos de hemoglobinas que podem ser obtidas incluem, mas não se limitam a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), HbBarts ( $\gamma_4$ ), HbH ( $\beta_4$ ) e Hb Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ), Hb Portland II ( $\zeta_2\beta_2$ ), Hb Portland III ( $\zeta_2\delta_2$ ), Hb Gower I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), e Hb Gower II ( $\alpha_2\epsilon_2$ ). A hemoglobina estará isenta de material celular e de outros contaminantes. Estas hemoglobinas e, especialmente, variantes de hemoglobina que autopolimerizam, variantes que evitam a dissociação do tetramero, variantes com uma afinidade por oxigénio intrínseca diminuída, variantes que são estáveis em meio alcalino, variantes que são estáveis em ácido, variantes que não se auto-oxidam e/ou variantes que não se ligam a haptoglobina pelo uso dos genes de alfa e/ou beta globina variantes, descritos na Secção 5.2., supra, são valiosos para uso em substitutos do sangue.

Noutra concretização, a globina do tipo alfa e/ou do tipo beta, pode ser modificada quimicamente usando procedimentos conhecidos na arte, para aumentar a estabilidade do tetramero e/ou diminuir a afinidade por oxigénio (ver Secção 2.1.2., supra onde se descrevem exemplos destes procedimentos). Pode-se modificar uma globina do tipo alfa ou do tipo beta, do tipo selvagem ou variante. Estas hemoglobinas modificadas quimicamente podem, também, ser usadas em substitutos de sangue.

As composições de hemoglobina, para além de serem usadas em substitutos de sangue, podem ser usadas num expansor de plasma sanguíneo, numa composição farmacêutica com um transportador aceitável e com outros expansores de plasma, ou em qualquer aplicação onde seja necessário um transportador de oxigénio fisiológico. Os transportadores farmacêuticos podem ser tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hank ou Ringer, solução salina fisiológica, uma mistura consistindo em solução salina e glucose, e solução heparinizada de citrato de

sódio-ácido cítrico-dextrose. A hemoglobina produzida pelos processos do presente invento pode ser misturada com substitutos de plasma do tipo coloidal e com expansores de plasma tais como polissacáridos lineares (p.e., dextrano), hidroxietil-amido, gelatina fluida equilibrada e outras proteínas de plasma. Adicionalmente, a hemoglobina pode ser misturada com substitutos de plasma poliméricos, solúveis em água, fisiologicamente aceitáveis, exemplos dos quais incluem poli(álcool vinílico), poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona, e condensados de óxido de etileno-polipropilenoglicol. Em Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Col., Easton, PA, última edição, podem-se encontrar técnicas e formulações para administração das composições compreendendo a hemoglobina.

Os exemplos seguintes são apresentados a título ilustrativo e não limitativo.

#### 6.0. EXEMPLO 1: EXPRESSÃO DA BETA-GLOBINA PORTO ALEGRE NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA CONTENDO O PROMOTOR GAL10

Como aqui se descreveu detalhadamente, modificou-se a beta-globina natural para obter um gene da beta-globina Porto Alegre, por substituição de um fragmento AccI-NcoI de 104 pb do gene da beta-globina natural, por um oligonucleótido sintético, contendo uma cisteína como aminoácido 9 (em vez de uma serina). Subsequentemente, clonou-se o gene da beta-globina Porto Alegre no vector de expressão de levedura YEp51 para obter o plasmídeo YEpWB51/PORT. Usou-se o YEpWB51/PORT para transformar a estirpe de levedura Sc340, uma estirpe hem1. A quantificação do ARN por análise da auto-radiografia mostrou que o ARN-m para a beta-globina Porto Alegre era cerca de 6,0% do ARN total de levedura. A análise por mancha Western indicou que a beta-globina Porto Alegre foi expressa.

#### 6.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN-ligase T4, foram obtidas em New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. O

ADN de plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de um litro das células de E. coli transformadas e purificado por centrifugação num gradiente de CsCl.

#### 6.2. CLONAÇÃO DO GENE DA BETA GLOBINA PORTO ALEGRE NO VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA YEp51

Na Figura 3A mostra-se o procedimento geral usado para clonar o gene da beta-globina Porto Alegre no vector de expressão de levedura YEp51. Digeriu-se o plasmídeo pSPBC (ver Figura 2 onde se mostra o mapa de restrição parcial do pSPBC) com AccI e HindIII. A digestão com esta combinação de enzimas gerou dois fragmentos; um ADN de 500 pares de bases (pb) contendo o gene da beta-globina e um fragmento de 2 800 pb do plasmídeo. O fragmento de 500 pb foi isolado num gel de agarose a 0,6%. Depois, a banda foi excisada do gel, electro-eluiu-se o ADN e precipitou-se com etanol. O ADN precipitado foi centrifugado numa Centrífuga Eppendorf, removeu-se o sobrenadante e secou-se o sedimento de ADN sob vácuo.

O fragmento de ADN de 500 pb, contendo o fragmento do gene da beta-globina natural, isolado a partir de pSPBC era compatível com AccI na extremidade 5', enquanto que a extremidade 3' era compatível com HindIII. Para modificar a extremidade 5' do fragmento isolado usou-se um oligonucleótido sintético. Este oligonucleótido de cadeia dupla (104 pb) continha um codão para a cisteína como aminoácido 9, em vez de um codão para a serina, e possuía uma extremidade compatível com AccI, na sua extremidade 3', e uma extremidade compatível com Sali na sua extremidade 5' (ver Figura 3A). A extremidade 3' do fragmento isolado não recebeu qualquer adaptador, uma vez que o sítio HindIII era compatível com o sítio HindIII introduzido no YEp51.

Clivou-se o plasmídeo receptor YEp51, com as enzimas de restrição Sali e HindIII. Para inserir o fragmento isolado contendo o gene da beta-globina, preparou-se uma ligação de 3 vias (ver Figura 3A). A reacção de ligação foi realizada usando procedimentos de ligação convencionais (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, New York). Usou-se a mistura de ligação para transformar as células *E. coli* HB101, usando o procedimento de transformação convencional. Espalharam-se as células sobre placas, contendo meio LB com 100 mg/l de ampicilina. Incubaram-se as placas de um dia para o outro a 37°C. Recolheram-se quarenta e oito colônias das placas de ampicilina e inoculou-se uma cultura de 5 ml com o transformante individual. Desenvolveram-se as culturas de um dia para o outro, a 37°C com agitação vigorosa. Isolou-se o ADN de plasmídeo a partir de 1,5 ml da cultura, de um dia para o outro, usando um procedimento rápido de isolamento de plasmídeo em meio alcalino (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Digeriu-se o plasmídeo de cada transformante com *EcoRI* para confirmar a presença de um fragmento de ADN, contendo o gene da beta-globina Porto Alegre. O plasmídeo contendo o gene da beta-globina Porto Alegre foi designado por YEpWB51/Port. Na Figura 4 mostra-se o mapa do plasmídeo YEpWB51/Port.

#### 6.3. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS Sc340 COM YEpWB51/Port

A estirpe de levedura Sc340 foi cedida pelo Dr. J.E. Hopper do Hershey Medical Center. O genotipo desta estirpe é:

MATa ura3-52, leu2, ade1, his3::GAL10<sup>uas</sup>-GAL4-URA<sup>3+</sup>, MEL<sup>+</sup>.

Transformaram-se as células Sc340 com os plasmídeos YEpWB51/Port e YEp51 (controle). Realizou-se o método de transformação de esferoplasto, usando o procedimento publicado (Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:1929-1933). Seleccionaram-se os transformantes, por deposição em placas num meio mínimo, contendo 0,67% de base de azoto de levedura Bacto sem aminoácidos, 2% de glucose, 20 mg/l de sulfato de adenina, 20 mg/l de histidina, e 20 mg/l de uracilo. Incubaram-se as placas a 28°C durante três dias e examinaram-se quanto à formação de colônias.

Recolheram-se as colônias destas placas, após a incubação, e pré-cultivaram-se em meio mínimo de levedura (0,67% de base de azoto de levedura sem aminoácidos) contendo 0,5% de glucose mais 20 mg/l, de cada um, de adenina, uracilo e histidina. Depois

usou-se a cultura, de um dia para o outro, para inocular 1 ~~000~~ ml do meio mínimo de levedura, contendo 2% de ácido láctico, 3% de glicerol e os aminoácidos apropriados. Inocularam-se as culturas até um valor de D.O.<sub>600</sub> de 0,02. Desenvolveram-se as culturas a 30°C até atingirem um valor de D.O.<sub>600</sub> de 0,20 (usualmente após 48 horas). A indução foi iniciada pela adição, ao meio, de galactose até uma concentração final de 2%. Após quarenta e oito horas, colheram-se as culturas por centrifugação e lavou-se o sedimento com NaCl 150 mM. Dividiu-se o sedimento em duas partes. Usou-se uma parte para o isolamento do ARN e manteve-se a outra a -70°C, para a análise por mancha Western.

#### 6.4. QUANTIFICAÇÃO DO ARN DAS CÉLULAS Sc340, TRANSFORMADAS COM OS PLASMÍDEOS YEp51 E YEp51WB/Port

O ARN foi isolado usando os procedimentos publicados (Meyhack et al., 1982, The EMBO Journal 1:675-680 ou Carlson e Botstein, 1982, Cell 28:145). Lavaram-se as células de levedura com NaCl 150 mM e ressuspendeu-se o sedimento em tampão de ARN (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6, EDTA 0,1 M e 1% de SDS). Adicionaram-se, aproximadamente, 0,5 g de pérolas de vidro (0,45-0,5 mm) aos tubos. Adicionou-se um volume igual de uma mistura de fenol (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1, equilibrada com tampão de ARN sem SDS). Quebraram-se as células de levedura, por agitação num agitador de vórtice, à velocidade máxima, durante 2,5 minutos e colocou-se a amostra em gelo durante 3 minutos. Repetiu-se o passo anterior duas vezes mais. Adicionaram-se iguais volumes de tampão de ARN e de mistura de fenol às células e centrifugaram-se os tubos. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo Corex limpo e adicionaram-se, a cada tubo, 2,5 volumes de etanol. Deixou-se o ARN precipitar a -20°C, durante 4 a 6 horas. Sedimentou-se o ARN por centrifugação e secou-se sob vácuo. Suspendeu-se o sedimento de ARN em água esterilizada.

Desnaturou-se o ARN total usando o método de glioxal (Thomas, P., 1983, em "Methods in Enzymology", Colowich, S. P. e Kaplan, N. O. eds. Vol. 100: pp. 255-266, Academic Press, New York). Submeteu-se o ARN a electroforese num gel de agarose a 1,1% em NaPO<sub>4</sub> 10 mM durante, aproximadamente, 4 horas a 75 volts

(constante). Após a electroforese estar completa transferiu-se o ARN para papel Amersham Hybond-N (Thomas, P., 1983, em "Methods in Enzymology" Colowich, S. P. e Kaplan, N. O. eds. Vol. 100: pp 255-266, Academic Press, New York).

Hibridou-se o ARN de levedura total, ligado ao papel de filtro, com o ADN de beta-globina radioactivamente marcado. As hibridações foram realizadas a 42°C, de um dia para o outro, em formamida a 50% (v/v) com 5x SSC (SSC: NaCl 3,0 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7,5); NaPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6,5; 250 µg/ml de ADN de esperma de salmão; e solução 1X de Denhardt; (solução de Denhardt: 0,02% de Ficcol, 0,02% de poli(carbonato de vinilo) e 0,02% de BSA, fracção V). O ARN-m CYH2, que codifica a proteína ribossômica de levedura L19, foi usado como controlo. A sonda foi o plasmídeo mp10CYH22 que contém o gene CYH2 de levedura. Após as hibridações, lavaram-se os filtros três vezes, à temperatura ambiente, em SSC 2X e 0,1% de SDS, e quatro vezes a 50°C em SSC 0,1X e 0,1% de SDS. Exporam-se os filtros a películas de raios X, durante um período desde uma hora até ao dia seguinte, dependendo da radioactividade. Revelaram-se as películas de raios X num revelador de películas automático Konica.

Na Figura 5 mostraram-se os resultados destas hibridações de mancha de ARN, que mostram os resultados de ARN isolado a partir de levedura transformada com um plasmídeo de controlo, não contendo quaisquer sequências de globina (faixa 1), um plasmídeo contendo sequências codificando a beta-globina (faixa 2), e um plasmídeo contendo sequências codificando a beta-globina Porto Alegre (faixa 3). Os resultados indicam que as amostras de ARN-m de todas as fontes estavam intactas e não se detectou qualquer degradação. Observou-se, também, que na faixa 1 não pôde ser detectado qualquer ARN-m de beta-globina, contendo esta faixa apenas o plasmídeo original. Estes resultados indicam que a hibridação, não específica, da sonda de beta-globina é mínima.

Analísaram-se as auto-radiografias, contendo bandas correspondentes ao ARN-m de beta-globina e de CYH2, usando o analisador de gel LKB. Na Figura 6 mostram-se os resultados obtidos no ana-

lisador. Pode observar-se claramente que a abundância de ARN-m de CYH2 em todas as três faixas é aproximadamente a mesma, enquanto que a abundância do ARN-m de beta-globina Porto Alegre no 340g2P é elevada.

#### 6.5. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA BETA-GLOBINA PORTO ALEGRE EXPRESSA

Na análise da beta-globina Porto Alegre expressa estiveram envolvidos quatro passos principais:

(1) preparação da amostra via disrupção das células de levedura, usando pérolas de vidro, seguida da solubilização da proteína usando tampão contendo SDS.

(2) Separação da proteína extraída via electroforese em gel de poliacrilamida.

(3) Transferência da proteína para papel de nitrocelulose por aplicação de um campo eléctrico transversal.

(4) Detecção da proteína de globina usando um procedimento de anticorpos em duas fases. O anticorpo primário é específico da hemoglobina. O anticorpo secundário é um conjugado de  $^{125}\text{I}$  e de um anticorpo contra IgG do animal no qual o primeiro anticorpo foi criado. O  $^{125}\text{I}$  foi depois detectado por auto-radiografia.

Às amostras de levedura descongeladas (0,02 g de peso húmido) adicionou-se solução salina, tamponada com fosfato (PBS, NaCl 0,9 M, fosfato 0,01 M, pH 7,6) (2 ml). Centrifugaram-se as amostras a 4°C, durante 10 minutos, e decantaram-se. Adicionou-se tampão de disrupção frio (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, PMSF 0,5 mM, pH 8,0) preparado imediatamente antes do uso (0,2 ml), a que se seguiu a adição de pérolas de vidro arrefecidas em gelo, em quantidade suficiente para atingir apenas a superfície superior do líquido. Após agitação num agitador de vórtice, durante 30 segundos à velocidade máxima, colocaram-se as amostras em gelo durante 5 minutos; repetiu-se este passo mais duas vezes. A cada amostra adicionou-se tampão de disrupção arrefecido em gelo (1 ml) e transferiu-se o homogeneizado para um tubo Eppendorf. Noutro tubo Eppendorf, combinaram-se 200 µl de homogeneizado com 200 µl de tampão de amostra 2X, descontínuo, convencional, recentemente preparado (Laemli, 1970, Nature 227:680-685) e

ferveu-se a amostra durante 10 minutos.

Após centrifugação durante 10 minutos, carregaram-se as amostras num gel desnaturante, descontínuo, no qual o gel de empacotamento era acrilamida a 3,75% e o gel de separação era acrilamida a 12%. Aplicou-se ao gel de empacotamento uma corrente constante de 25 mA/cm<sup>2</sup> e ao gel de separação uma corrente de 33 mA/cm<sup>2</sup>.

Após a electroforese estar completa e a banda de corante ter atingido o fundo do gel de separação, removeram-se os geles da unidade de electroforese e cobriram-se as placas, em separado, com água desionizada corrente. Descarregou-se o gel de empacotamento e separou-se o gel inferior da placa. Encheu-se a unidade de transferência com tampão de transferência (2 l de metanol, 30,3 g de base tris, 144 g de glicina, pH 8,30, em 10 l de água destilada). Colocaram-se 2 l do tampão de transferência num recipiente pouco profundo. A sanduiche de transferência, consistindo numa sequência de gaze de poros largos, papel de mancha ("blotting paper") 3 M, gel, uma porção de papel de nitrocelulose pré-cortada para cobrir apenas o gel, papel de mancha 3 M, e outra porção de gaze de poros largos, foi montada sob o tampão no recipiente pouco profundo.

A proteína foi depois transferida do gel para o papel de nitrocelulose, por aplicação de uma voltagem de 40 V durante 1,5 horas. Após a transferência estar completa, removeu-se a folha de nitrocelulose e colocou-se num pequeno recipiente, pouco profundo, coberto, com 50 ml de solução bloqueante (20 g de leite seco, 0,5 ml de Nonidet-P40 (Sigma) em 1 l de PBS). Agitou-se o filtro a 70 rpm durante 45 minutos. Substituiu-se a solução por 50 ml de solução bloqueante fresca e agitou-se durante mais 45 minutos. Descarregou-se a solução bloqueante e adicionaram-se 25 ml de solução bloqueante fresca. Após a adição de 25 ml de anticorpo primário, agitou-se a amostra durante 1,5 horas. Descarregou-se a solução e lavou-se o filtro com 50 µl de solução bloqueante fresca (4 x 15 minutos). Depois adicionaram-se 25 ml de solução bloqueante e 25 µl de anticorpo secundário. Agitou-se a solução e

lavou-se, subsequentemente, com 50 ml de solução bloqueante fresca (6 x 10 minutos).

Para quantificar a quantidade de beta-globina presente, usou-se o procedimento seguinte. Primeiramente a globina presente foi detectada por auto-radiografia. Analisou-se a auto-radiografia usando um densitômetro laser e estimou-se a quantidade contida em cada amostra usando uma curva de regressão com padrões de hemoglobina. O padrão usado era uma apo-beta-globina, purificada por HPLC de fase inversa a partir de lisado de glóbulos vermelhos. O limite de detecção para a auto-radiografia é de cerca de 2 ng. Detectaram-se aproximadamente, 0,09 mg de beta-globina Porto Alegre por 100 mg de proteína de levedura (0,09%).

#### 7.0. EXEMPLO 2: EXPRESSÃO DA BETA-GLOBINA NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA CONTENDO UM PROMOTOR HÍBRIDO E UMA SEQUÊNCIA DE TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO ADH1

Construiu-se um promotor híbrido pela fusão da sequência activadora, a montante, do promotor GAL1-10 com os elementos de promotor, a jusante, do promotor IDH3 (aqui depois designadas por extremidade 3' do promotor IDH3 ou IDH3-3'). Excisou-se a "cassette" contendo o promotor híbrido + o gene da beta-globina + o terminador ADH1, e clonou-se no vector de vaivém de levedura, YEp13. Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo resultante, pNML-VG-1, e analisaram-se as proteínas expressas, por análise de mancha Western.

#### 7.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN-ligase T4, foram obtidas em New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de 1 litro de células transformadas e purificado por centrifugação em gradiente de CsCl.

## 7.2. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO L19Bt CONTENDO O GENE DA BETA-GLOBINA E O TERMINADOR ADH1

O gene da beta-globina foi obtido por digestão do plasmídeo mp18BHs com SalI e HindIII (ver Figura 7 onde se mostra o mapa de mp18BHs). O fragmento de 600 pb foi isolado por electroeluição.

Digeriu-se o plasmídeo AAH5 com HindIII e com BamHI (Ammerer, G., Methods in Enzymology, 101, pp. 192-201, 1983). O AAH5 foi cedido pelo Dr. Ben Hall da University of Washington, Seattle (ver Figura 8). O fragmento resultante de 450 pb foi isolado por electroforese em gel. Subsequentemente, precipitou-se a banda contendo o fragmento de 450 pb com etanol e digeriu-se com SphI. O fragmento de 320 pb (HindIII-SphI) contendo as sequências de terminação de transcrição ADH1, foi isolado por electroeluição.

O plasmídeo pUC19 foi cortado com SalI e SphI. Preparou-se uma mistura reaccional de ligação de três vias entre o fragmento pUC19, o fragmento de beta-globina SalI-HindIII e o fragmento terminador de HindIII-SphI de ADH1. Usou-se a mistura de ligação para transformar células de E. coli competentes (DH5 $\alpha$ ). Seleccionaram-se os transformantes em placas de ampicilina (100 mg/l). O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de vinte transformantes (clones) e analisado por digestão de restrição com SalI-HindIII. O plasmídeo resultante, contendo os dois inseridos anteriores no pUC19, foi designado por L19BAT, e é mostrado na Figura 9. Digeriu-se o ADN com SphI e com ApaI e isolou-se por electroeluição um fragmento de 920 pb contendo o gene de beta-globina e o terminador ADH1, e usou-se para a construção do plasmídeo contendo o promotor IDH3, o gene de beta-globina e o terminador ADH1.

## 7.3. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pUC19-HBAt

O fragmento promotor IDH3-3' foi sintetizado, por PCR usando os iniciadores apropriados e ADN molde a partir do plasmídeo gp491. Como iniciadores foram usadas as sequências seguintes:

-141

-121

IDH3-3' iniciador 5': 5'----ATccccgggAAGGTTGAAACCAAGTTCCTG---3';

SmaI



#### 7.5. CLONAGEM DA "CASSETTE" PROMOTOR HÍBRIDO-GENE DA BETA-GLOBINA NO VECTOR DE VAIVÉM YEp13

Digeriu-se o pUC19-GHBA<sub>t</sub> com SacI-SphI para excisar a "cassette" GAL10-UAS + IDH-3' + gene da beta-globina + terminador ADH1, do pUC19, que foi subsequentemente preenchido nas suas extremidades. Isolou-se o fragmento de 1,43 kb resultante, por electroeluição.

Digeriu-se o plasmídeo YEp13 (cedido por Fred Winston, Harvard Medical School), que contém os marcadores LEU2 (levedura) e Amp<sup>R</sup> (E-Coli), com BamHI e preencheram-se as suas extremidades; o ADN linear resultante foi isolado por electroeluição.

Estabeleceu-se uma ligação entre o inserido e o vector, e usou-se a mistura de ligação para transformar células de E. coli competentes (DH5 $\alpha$ ). Os transformantes foram seleccionados em placas de ampicilina (100 mg/l). Isolou-se o ADN de plasmídeo de 24 transformantes e analisou-se por digestão de restrição com HindIII, EcoRI, EcoRI-SalI. Na Figura 13 mostra-se o mapa do plasmídeo resultante, pNML-V-G-1.

#### 7.6. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURA DA ESTIRPE Sc340 COM pNML-V-G-1

A estirpe Sc340 tem o genotipo seguinte: MATa, ura3-52, leu2, ade1, MEL+, [his3::GAL10 (UAS+P) + GAL4 + URA3]. Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo pNML-V-G-1 usando o procedimento de esferoplasto (Rose, M. et al., 1989, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 112-115). Para minimizar o fundo nas placas de controlo e aumentar a eficiência da transformação, o meio de regeneração continha sorbitol, 1 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,1% de base de azoto de levedura e 2% de glucose. O meio foi esterilizado por filtração. O meio de cultura em placas foi preparado misturando 182 g de sorbitol, 20g de ágar, 6,7 g de YNB Difco sem aminoácidos, glucose, os aminoácidos requeridos com excepção da leucina, em 1 l de água destilada. O ágar do topo foi preparado por mistura de 18,2 g de sorbitol, 2 g de ágar, 0,67 g de YNB Difco sem aminoácidos, 2 g de glucose e os aminoácidos requeridos,

em 100 ml de água destilada.

Para a cultura de partida, as células foram cultivadas, de um dia para o outro, em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 0,5% de glucose e suplementado com uracilo, adenina, e histidina. Inocularam-se 500 ml de meio SD, suplementado com citrato férrico 200  $\mu$ M e com 20 mg/l de cada um de adenina, uracilo e histidina, com a cultura de partida até um valor de D.O.<sub>600</sub> de 0,02. A cultura foi incubada com agitação (300 rpm) a 30°C e foi induzida com 2% de galactose, durante um período de 4 horas, antes da recolha das amostras para análise.

#### 7.7. ANÁLISE POR MANCHA WESTERN DA BETA-GLOBINA EXPRESSA

A beta-globina expressa foi quantificada por análise de mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6. supra. Os resultados indicam que até 5,4% da proteína de levedura total, expressa nas células Sc340 transformadas, era beta-globina.

#### 8. EXEMPLO 3: EXPRESSÃO POR GAMA-GLOBINA NATURAL NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA CONTENDO O PROMOTOR GAL10 E O TERMINADOR ADH1

O gene da gama-globina foi obtido a partir do plasmídeo pJW151 usando PCR. O gene da gama-globina foi modificado por PCR de forma a ter um sítio SalI na extremidade 5' e um sítio HindIII na extremidade 3'. O gene da gama-globina modificado foi clonado no vector de expressão de levedura YEp51T/NAT, que contém a sequência de terminação da transcrição ADH1, o promotor GAL10 e a sequência de ADN codificando o gene da beta-globina. O YEp51T/NAT tinha sido cortado com SalI e HindIII para remover o gene da beta-globina. O plasmídeo contendo o gene da gama-globina foi designado por YEp51T/G. A estirpe de levedura Sc340 foi transformada com YEp51T/G e o transformante foi designado por 340g2G. Após o crescimento de 340g2G e indução, por galactose, analisaram-se as proteínas expressas, por análise de mancha Western. Os resultados da análise por mancha Western indicam que a gama-globina foi expressa.

### 8.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição e as enzimas de modificação do ADN foram obtidas em Boehringer-Mannheim, Bethesda Research Laboratories, Perkin-Elmer ou New England Biolabs. Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores.

A estirpe de E. coli usada para todas as transformações com bactérias foi a estirpe DH5 $\alpha$ .

Os oligonucleótidos foram sintetizados num sintetizador de ADN 380B da Applied Biosystem Inc. usando a química do cianoetilo. A reacção em cadeia com polimerase (PCR ou reacção PC) foi realizada num ciclizador térmico de ADN obtido na Cetus, Inc..

### 8.2. CLONAÇÃO DO GENE DA BETA-GLOBINA NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA YEp51

Na Figura 3B mostra-se o procedimento geral usado para clonar o gene de beta-globina no vector de expressão de levedura YEp51. Digeriu-se o plasmídeo pSPBC (ver Figura 2 onde se mostra o mapa de restrição de pSBBC) com NcoI e HindIII. A digestão com esta combinação de enzimas gerou dois fragmentos, um fragmento de ADN de 600 pares de bases contendo o gene da beta-globina e o fragmento de 2 700 pb do plasmídeo. O fragmento de 600 pb foi isolado a partir de um gel de agarose a 0,6%. Após a banda ter sido excisada do gel, o ADN foi electroeluído e precipitado com etanol. O ADN precipitado foi centrifugado numa centrífuga Eppendorf, removeu-se o sobrenadante e secou-se o sedimento de ADN sob vácuo.

O fragmento de 600 pb foi modificado por adição de adaptador, antes da clonação no plasmídeo YEp51. O fragmento de ADN contendo o gene da beta-globina, isolado a partir de pSBBC era compatível com NcoI na extremidade 5', enquanto que a extremidade 3' era compatível com HindIII. Estas extremidades tiveram de ser modificadas de modo a poderem ser compatíveis com os sítios de restrição presentes em YEp51. Para modificar a extremidade 5' do fragmento isolado, usou-se um adaptador sintético. Este adaptador tinha uma extremidade compatível com NcoI na sua extremidade 3' e

uma extremidade compatível com SalI na sua extremidade 5' (ver Figura 2). A extremidade 3' do fragmento isolado não recebeu qualquer adaptador, uma vez que o sítio HindIII era compatível com o sítio HindIII introduzido no YEp51.

O plasmídeo receptor YEp51 foi clivado com as enzimas de restrição SalI e HindIII. Para inserir o fragmento isolado contendo o gene da beta-globina, introduziu-se uma ligação de três vias (ver Figura 3B). A reacção de ligação foi realizada de acordo com os procedimentos de ligação convencionais (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Usou-se a mistura de ligação para transformar células E. coli HB101, usando o procedimento de transformação convencional. As células foram espalhadas em placas contendo meio LB com 100 mg/l de ampicilina. As placas foram incubadas de um dia para o outro a 37°C. Recolheram-se quarenta e oito colónias das placas de ampicilina e inoculou-se uma cultura de 5 ml com os transformantes individuais. As culturas foram desenvolvidas de um dia para o outro a 37°C com agitação vigorosa. O ADN do plasmídeo foi isolado a partir de 1,5 ml da cultura de um dia para o outro, usando um procedimento rápido de isolamento de plasmídeos. Um plasmídeo de cada transformante foi digerido com EcoRI para confirmar a presença de um fragmento de ADN contendo o gene da beta-globina natural. O plasmídeo contendo o gene da beta-globina natural foi designado por YEpWB51/Nat. Na Figura 14 mostra-se o mapa do plasmídeo YEpWB51/Nat.

### 8.3. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DO TERMINADOR ADH1 NO YEpWB51/Nat

Na figura 15 mostra-se a estratégia usada para inserir as sequências do terminador ADH1 no YEpWB51/Nat. O plasmídeo YEpWB51/Natd- (d=dam e dcm-, isto é, metilação menos) foi digerido com as enzimas de restrição BclI e HindIII. Após a digestão, isolou-se o fragmento de ADN de 6,8 kb, contendo o gene da beta-globina e o vector, a partir de um gel de agarose a 0,6% (em TBE 1X, Tris 0,1 M, pH 8,0, ácido bórico 0,09 M, EDTA 1 mM). O ADN foi electroeluído a partir da fatia de gel e precipitado com etanol a -20°C. O ADN precipitado foi centrifugado numa centrífuga

Eppendorf durante 15 minutos e o sedimento foi seco sob vácuo. Suspendeu-se o ADN em 20 ml de H<sub>2</sub>O.

As sequências de terminação da transcrição de ADH1 foram isoladas a partir do plasmídeo AAH5 (Ammerer, G., 1983, Methods in Enzymology, 101, pp 192-201). O AAH5 foi cedido pelo Dr. Ben Hall da University of Washington, Seattle. O plasmídeo AAH5 foi digerido com BamHI e HindIII (ver Figura 8 onde se mostra o mapa do plasmídeo AAH5). A digestão com esta combinação de enzimas gerou três fragmentos. Um fragmento de ADN de 450 pares de base, contendo a sequência de terminação da transcrição de ADH1, foi isolado a partir do gel de agarose a 0,6%. O ADN foi electroeluído a partir da fatia de gel e precipitado com etanol a -20°C. O ADN precipitado foi centrifugado numa centrífuga Eppendorf, durante 15 minutos, e o sedimento foi seco sob vácuo. O ADN foi suspenso em 20 µl de H<sub>2</sub>O.

O fragmento de ADN contendo o terminador da transcrição ADH1, isolado a partir do AAH5, era compatível com BamHI na extremidade 3', enquanto que a extremidade 5' era compatível com HindIII. Estas extremidades eram compatíveis com os sítios de restrição presentes no YE

WB51/Nat.

O plasmídeo receptor YE

WB51/Natd- foi clivado com as enzimas de restrição BclI e HindIII. Como se mostra na Figura 15, introduziu-se uma ligação de duas vias para inserir o fragmento isolado. Usou-se a mistura de ligação para transformar células E. coli HB101 usando procedimentos de transformação convencionais. Espalharam-se as células sobre placas contendo meio LB com 100 mg/l de ampicilina. As placas foram incubadas de um dia para o outro a 37°C. Recolheram-se vinte e quatro colónias das placas de ampicilina e inoculou-se uma cultura de 5 ml com os transformantes individuais. As culturas foram desenvolvidas de um dia para o outro a 37°C com agitação vigorosa. O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de 1,5 ml da cultura de um dia para o outro, usando procedimentos mini-preparativos convencionais em meio alcalino (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New

York). Digeriu-se o plasmídeo de cada transformante com as enzimas de restrição PstI e HindIII para confirmar a presença de um fragmento de ADN contendo o terminador de ADH1. O plasmídeo contendo o gene da beta-globina natural com o terminador ADH1 foi designado por YEp51T/NAT e mostra-se na Figura 16.

#### 8.4. CLONAGEM DO GENE DA GAMA-GLOBINA NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA YEp51T/NAT

Na Figura 17 mostra-se o procedimento geral usado para clonar o gene da gama-globina no vector de expressão de levedura YEp51T/NAT, resultando na construção do YEp51T/G.

O gene da gama-globina foi sintetizado por PCR usando os iniciadores apropriados (que a seguir se apresentam) e o ADN de plasmídeo pJW151 (Wilson, J.T., et al., Nucleic Acid Research, 5:563-581, 1978) como molde. Na Figura 18 mostra-se a sequência do ADN da gama-globina. Na Figura 19 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese do gene. O produto de PCR foi analisado por electroforese num gel de agarose a 1,5% (em TBE 1 X). O produto de PCR de 530 pb foi removido do gel por electroeluição e o ADN foi precipitado com etanol. O produto de PCR purificado foi depois digerido com as enzimas de restrição SalI (extremidade 5') e HindII (extremidade 3'). O produto de PCR digerido foi extraído com fenol e precipitado com etanol.

O plasmídeo YEp51T/NAT, que contém o gene da beta-globina humana foi digerido com SalI e HindIII para remover o gene da beta-globina. O plasmídeo digerido foi submetido a electroforese num gel de agarose a 0,6% (em TBE 1 X). Electroeluiu-se um fragmento de 7 000 pb e precipitou-se com etanol.

Preparou-se uma mistura reaccional, de ligação entre a gama-globina, obtida por digestão do produto de PCR anteriormente descrito, e o YEp51T/NAT cortado com SalI e HindIII (7 000 pb). Usou-se a mistura de ligação para transformar células de E. coli DH5 $\alpha$  usando o procedimento de transformação convencional, e colocaram-se as células em placas de LB contendo ampicilina (100 mg/l). O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de 20 clones e di-

gerido com a enzima de restrição PstI. O plasmídeo resultante foi designado por YEp51T/G (Figura 20).

#### 8.5. TRANSFORMAÇÃO E CRESCIMENTO DAS CÉLULAS DE LEVEDURA DA ESTIRPE Sc340 COM O PLASMÍDEO YEp51T/G

Transformaram-se as células de levedura da estirpe Sc340 com o plasmídeo YEp51T/G (Rose, et al., 1989, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 112-115). A cultura de partida foi desenvolvida em meio SD suplementado com adenina e histidina, e com 3% de glicerol e 2% de lactato, como fonte de carbono. Usou-se a pré-cultura para inocular 2 l do meio anterior no fermentador Braun Biostat E. O pH foi mantido a 5,5 usando uma solução de hidróxido de amônio a 5%. A  $pO_2$  foi mantida a 80% até a cultura ter sido induzida com galactose, após o que este valor diminuiu para 10%. A velocidade do agitador foi ajustada a 500 rpm e depois reduzida para 100 rpm na altura da indução com galactose. A cultura foi incubada a 30°C e desenvolvida até um valor de  $DO_{600}$  de 30,4 após o que foi induzida com galactose adicionada a uma velocidade de 5 g/l/hora. As amostras foram recolhidas durante um período de 0 a 74 horas após a indução, para análise de globina.

#### 8.6. ANÁLISE POR MANCHA WESTERN DA GAMA-GLOBINA EXPRESSA

A gama-globina expressa foi quantificada por análise de mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6., supra. Os resultados indicam que até 0,05% da proteína de levedura total, na linha de células de levedura 340g2G era gama-globina.

#### 9.0. EXEMPLO 4: EXPRESSÃO DA VARIANTE DE GAMA-GLOBINA NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA CONTENDO UM PROMOTOR HÍBRIDO E UMA SEQUÊNCIA DE TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

Construiu-se um promotor híbrido por fusão da sequência activadora a montante do promotor GAL10, com os elementos de promotor a jusante do promotor IDH3 (aqui depois designado por extremidade 3' do promotor IDH3 ou IDH3-3'). Construiu-se o gene variante da gama-globina por modificação da sequência do iniciador da extremidade 5' para PCR, e substituição do penúltimo codão de

glicina por um codificando a valina, criando-se deste modo um sítio ApaLI. A "cassette" contendo o promotor híbrido + gene da gama-globina + terminador ADH1 foi construída num pUC19 e depois excisada e clonada no vector de vaivém de levedura, YEp51. As células de levedura Sc340 foram transformadas com o plasmídeo resultante, pNM-5G $\chi_{val}$ 1, e as proteínas expressas pelos transformantes, após a indução com galactose, foram analisadas por mancha Western.

### 9.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN-ligase-T4, foram obtidas em New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de 11 das células transformadas e purificado por centrifugação num gradiente de CsCl.

### 9.2. SÍNTESE DO GAMA(val)At

Usando os iniciadores apropriados e ADN do plasmídeo YEp51T/G (Secção 8.4. *supra*) como molde sintetizou-se, por PCR, um fragmento de ADN contendo  $\chi$ -globina a montante do terminador ADH1. Adicionou-se o sítio ApaLI ao gene da  $\chi$ -globina por alteração das sequências GGTCAT no gene para GTGCAC (sítio ApaLI). Na Figura 21 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese do gene. Usando o iniciador 5' da globina e um iniciador complementar com as sequências do terminador ADH 3', e ADN do plasmídeo YEp51T/G como molde, sintetizou-se por PCR um fragmento de 780 pb contendo o gene da  $\chi_{val}$ -globina e o terminador ADH1.

### 9.3. CONSTRUÇÃO DO pUC19-GH $\chi$ (val)At

O fragmento de PCR gama(val) foi cortado com ApaLI e SphI (fragmento #1). O ADN do plasmídeo pUC19 foi cortado com SacI/SphI e isolou-se um fragmento de ADN linear (fragmento #2). O ADN do pUC19-GHBA<sub>t</sub> (Secção 8.3., *supra*) foi cortado com ApaLI e SacI, e isolou-se, por electroeluição, o fragmento de 510 pb contendo o promotor híbrido GAL-UAS-IDH3-3' (fragmento #3).

Inseriu-se uma ligação de três vias entre os três fragmentos anteriores. Usaram-se células de *E. coli* DH5 $\alpha$  para transformação. O ADN de 24 transformantes foi isolado por digestões alcalinas e analisado por digestões de restrição. O plasmídeo resultante, contendo todos os três fragmentos na orientação correcta, foi designado por pUC19-GH $\chi$ <sub>val</sub>At.

#### 9.4. CLONAGEM DA "CASSETTE" GH $\chi$ <sub>val</sub>At NO VECTOR DE VAIVÉM DE LEVEDURA YEp51

A "cassette" de expressão GH $\chi$ <sub>val</sub>At (1,29 kb) foi isolada por digestão de pUC19-GH $\chi$ <sub>val</sub>At com SacI/SphI. Preencheram-se as extremidades da "cassette" e clonou-se no YEp51 cortado com BamHI por ligação das extremidades preenchidas. Analisaram-se as amostras de ADN a partir de quarenta e oito clones de cada transformação, por digestão com ApaI. Os clones positivos mostraram quatro fragmentos e os clones negativos mostraram 3 fragmentos. Os clones positivos foram caracterizados ainda por digestão com diferentes enzimas. O clone positivo foi designado por pNM-5-G- $\chi$ <sub>val</sub>1. Na Figura 22 mostra-se o mapa do plasmídeo pNM-5-G- $\chi$ <sub>val</sub>1.

#### 9.5. TRANSFORMAÇÃO E CRESCIMENTO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc340 COM O PLASMÍDEO pNM-5G- $\chi$ <sub>val</sub>1

Usou-se o ADN do plasmídeo pNM-5-G- $\chi$ <sub>val</sub>1 para transformar células de levedura Sc340 (Rose et al., 1989, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 112-115). O transformante foi designado por 340-5GgVAL. Desenvolveu-se a cultura de partida a 30°C, de um dia para o outro, em meio contendo 0,5% de rafinose, 0,67% de base de azoto de levedura sem aminoácidos (Difco), e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, uracilo, histidina e triptofano, e usou-se para inocular um meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura sem aminoácidos, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, e suplementado com 20 mg/l de cada um de uracilo, histidina, adenina, e triptofano. Após 24 horas de crescimento a 30°C a cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Recolheram-se amostras, durante um período de 4 a 48 horas após a indução, para análise da globina por mancha Western.

#### 9.6. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GAMA-GLOBINA EXPRESSA

A gama-globina expressa foi quantificada por análise de mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. supra. Os resultados indicam que até 1% da proteína de levedura total no 340-5GgVAL era gama(val)-globina.

#### 10.0. EXEMPLO 5: EXPRESSÃO DE UM MUTANTE DE DELEÇÃO DE ALFA-GLOBINA NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA CONTENDO UM PROMOTOR HÍBRIDO E UMA SEQUÊNCIA DE TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE ADH1

Construiu-se um promotor híbrido pela fusão da sequência de activação a montante do promotor ADH2 com os elementos de promotor a jusante do promotor IDH3 (aqui depois designado por extremidade 3' do promotor IDH3 ou IDH3-3'). Especificamente, clonaram-se no plasmídeo pUC19, o promotor híbrido ADH2-UAS-IDH-3', o ADN da alfa-globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina, como se mostra na Figura 1E e o terminador GAL10. O plasmídeo resultante foi designado por pUC19-AHαGt. A "cassette" contendo o promotor híbrido + gene de alfa globina + o terminador GAL10, foi excisada e clonada no vector de vaivém de levedura, pPM40. Transformou-se a estirpe de levedura Sc1012 com o plasmídeo resultante, pNM-R-A-α1 e analisaram-se as proteínas expressas por análise de mancha Western.

#### 10.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN ligase T4 foram obtidas em New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de 1 litro das células de E. coli transformadas e purificado por centrifugação num gradiente de CsCl.

#### 10.2. CONSTRUÇÃO DO pUC19-GHαGt

##### 10.2.1. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO p19A1

Para construir o plasmídeo p19A1, o gene da alfa-globina foi obtido por reacção em cadeia com polimerase (PCR). O molde usado

para a PCR foi o plasmídeo pJW101 (Wilson et al., 1978, Nucl. Acids Res. 5: 563-580) e os iniciadores usados na reacção foram os iniciadores 51-A-1 e 519-A-3 (ver Figura 23).

O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição Sall e BamHI e o fragmento de 460 pb foi isolado a partir de um gel de agarose a 0,6% (TBE 1X). O ADN foi electroeluído a partir da fatia de gel e precipitado com etanol a -20°C. Centrifugou-se o ADN precipitado numa centrífuga Eppendorf durante 15 minutos. Secou-se o sedimento sob vácuo. Suspendeu-se o ADN em água a 20°C. Ligou-se o produto de PCR purificado ao plasmídeo pUC19, digerido com enzimas de restrição Sall e BamHI. A reacção de ligação foi realizada a 15°C de acordo com os procedimentos de ligação convencionais (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Usou-se a mistura de ligação para transformar células E. coli DH5α usando procedimentos de transformação convencionais. Espalharam-se as células sobre placas contendo meio LB com 100 mg/l de ampicilina. Incubaram-se as placas de um dia para o outro a 37°C. Recolheram-se vinte e quatro colónias das placas de ampicilina e inoculou-se uma cultura de 5 ml com os transformantes individuais. Desenvolveram-se as culturas de um dia para o outro a 37°C, com agitação vigorosa. O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de 1,5 ml e digeriu-se o ADN com a enzima de restrição HindIII. Oito clones mostraram o comprimento esperado dos fragmentos (290 pb e 200 pb). O plasmídeo resultante foi designado por p19A1.

#### 10.2.2. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO p19A1GT

Para construir o plasmídeo p19A1GT, obteve-se o terminador GAL10 por reacção em cadeia com polimerase (PCR). O molde usado para PCR foi o plasmídeo pCLUI e na Figura 24 mostram-se os iniciadores usados na reacção g10T-5B e G10t3ESS.

Digeriu-se o produto de PCR com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI e isolou-se um fragmento de 450 pb a partir de um gel de agarose a 0,6% (TBE 1X). O ADN foi electroeluído a partir da fatia de gel e precipitado com etanol a -20°C. Centrifugou-se o

ADN precipitado numa centrífuga Eppendorf durante 15 minutos. Secou-se o sedimento sob vácuo. Suspendeu-se o ADN em água a 20°C. Ligou-se o produto de PCR purificado ao plasmídeo p19A1 digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. A reacção de ligação foi realizada a 15°C de acordo com os procedimentos de ligação convencionais (Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Usou-se a mistura de ligação para transformar as células E. coli DH5α usando procedimentos de transformação convencionais. Espalharam-se as células sobre placas contendo meio LB com 100 mg/l de ampicilina. Incubaram-se as placas de um dia para o outro a 37°C. Recolheram-se vinte e quatro colónias a partir das placas de ampicilina e inoculou-se uma cultura de 5 ml com os transformantes individuais. As culturas foram desenvolvidas de um dia para o outro a 37°C, com agitação vigorosa. O ADN do plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de 1,5 ml e digeriu-se o ADN com a enzima de restrição SalI. Oito clones mostraram o comprimento esperado dos fragmentos (2 700 pb e 900 pb). O plasmídeo resultante foi designado por p19A1GT.

#### 10.2.3. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pUC19-GHαGt

Usou-se PCR para sintetizar um fragmento promotor híbrido, GHαGt, que contém o promotor híbrido GAL1-10-UAS/IDH3-3' e as primeiras 36 bases do ADN da alfa-globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina até, e incluindo, o sítio StuI no gene. Clonou-se o fragmento de PCR de 570 pb resultante no plasmídeo pUC19 cortado com SmaI, por ligação das extremidades preenchidas. A transformação foi realizada usando a estirpe de E. coli 510α.

O primeiro sítio de restrição na sequência de codificação da alfa-globina é StuI que começa 31 bases a jusante do codão de iniciação ATG. Sintetizou-se o iniciador 3' de modo a conter sequências complementares com a extremidade 3' do promotor IDH-3' e as primeiras 36 bases do ADN da alfa-globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina até ao sítio StuI. Na Figura 25 descrevem-se os iniciadores 5' e 3'. O molde usado para a PCR foi

o ADN do plasmídeo pUC19-GH $\beta$ At, que contém o promotor híbrido GAL1-10-UAS/TDH3-3'.

O fragmento de 570 pb, contendo o híbrido promotor-primeiras 36 bases do ADN da alfa-globina contendo uma deleção dos nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina, sintetizado usando os iniciadores anteriores, foi clonado no vector pUC19 por ligação das extremidades preenchidas. Este plasmídeo foi designado por pUC19-GH $\alpha$ '.

O fragmento 3' do gene da alfa-globina, contendo os sítios de clonação apropriados, foi preparado por PCR. Usou-se o plasmídeo pUC19-A1 como molde. Na Figura 26 descrevem-se os iniciadores 5' e 3' usados para sintetizar o gene.

Cortou-se o fragmento de 460 pb resultante com BamHI e SalI e clonou-se no vector pUC19 cortado com BamHI-SalI. Usou-se a estirpe 510 $\alpha$  de E. coli para a transformação, uma vez que esta estirpe produz ADN não metilado. A enzima StuI é ineficaz no corte de ADN metilado. Analisaram-se os transformantes por digestão com PvuII e o plasmídeo resultante, contendo o fragmento apropriado, foi designado por pUC19-A2.

A ADN dos plasmídeos pUC19-A2 e pUC19-GH $\alpha$ ' foi cortado com StuI-SalI e os fragmentos resultantes, um fragmento A linear e um fragmento B de 580 pb, respectivamente, foram isolados por electroeluição. Introduziu-se uma ligação entre os fragmentos A e B e usou-se a mistura de ligação para transformar células de E. coli 510 $\alpha$ . O plasmídeo resultante, contendo ambos os fragmentos na orientação correcta, foi designado por pUC19-GHA (ver Figura 27).

O ADN do vector plasmídeo pUC19 foi cortado com SphI. Isolou-se o ADN linear e desfosforilou-se (fragmento C). Cortou-se o ADN do plasmídeo pUC19-GHA com SphI e HindIII e isolou-se o fragmento resultante por electroeluição (fragmento D). O ADN do plasmídeo p19A1GT foi cortado com SphI e HindIII e isolou-se o fragmento resultante contendo parte do gene da alfa-globina e o terminador GAL10 (580 pb) (fragmento E). Introduziu-se uma

ligação de três vias entre os fragmentos C, D e E. Usou-se a mistura de ligação para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O plasmídeo contendo ambos os inseridos na orientação correcta foi designado por pUC19-GH $\alpha$ Gt (ver Figura 28).

#### 10.3. CLONAGEM DE ADH-2-UAS E TDH3-3'/ MUTANTE DE DELEÇÃO DE ALFA-GLOBINA GAL10 NO pUC19

Cortou-se o ADN de plasmídeo pUC19-ADH2-UAS com XbaI/SphI. O fragmento de ADN linear foi isolado (fragmento #1). O fragmento de ADN contendo TDH3-3'/mutante de deleção de  $\alpha$ -globina/terminador GAL10 (H $\alpha$ Gt), foi preparado por PCR usando o plasmídeo pUC19-GH $\alpha$ Gt como molde. Na Figura 29 mostra-se a sequência dos iniciadores usados para sintetizar o fragmento de ADN por PCR.

Cortou-se o fragmento de 1,04 kb, resultante, contendo TDH3-3'/mutante de deleção de alfa-globina/terminador GAL10 (H $\alpha$ Gt) com XbaI/SphI (fragmento #2). Introduziu-se uma ligação entre o fragmento #1 e #2. Transformaram-se células de *E. Coli* DH5 $\alpha$  e analisaram-se os digeridos de restrição do ADN obtido a partir dos transformantes. O plasmídeo contendo os fragmentos na orientação correcta foi designado por pUC19-AH $\alpha$ Gt. Na Figura 30 mostra-se o mapa deste plasmídeo.

#### 10.4. CLONAGEM DA CASSETTE AH $\alpha$ Gt NO pPM40

A "cassette" de expressão, AH $\alpha$ Gt, foi excisada por corte do ADN de plasmídeo pUC19-AH $\alpha$ Gt com SacI/SphI. Clonou-se o fragmento resultante de 1,3 kb no pPM40 de extremidades preenchidas, cortado com BamHI. Na Figura 31 mostra-se o mapa de pPM40. O plasmídeo resultante foi designado por pNM-R-A- $\alpha$ 1. Na Figura 32 mostra-se o mapa deste plasmídeo.

#### 10.5. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1012 COM pNM-R-A- $\alpha$ 1

A estirpe de levedura Sc1012 é um mutante hem1 que está bloqueado em ácido 5-aminolevulínico-sintetase, a primeira enzima no percurso bio-sintético do heme. A Sc1012 tem o genótipo seguinte: ade1, ade2, hem1-1, his3, leu2-3, 112 ura3-1. Transformou-se a estirpe de levedura Sc1012 com o plasmídeo pNM-R-A- $\alpha$ 1 usando o procedimento de esféroplasto (Rose, M. et al., 1989, Methods in

Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 112-115). No protocolo anterior fizeram-se duas modificações. A quantidade de YEP adicionado durante o passo de regeneração foi reduzida de 1% para 0,1%. Ao ágar de regeneração não se adicionou caldo de YEP.

Para a cultura de partida as células foram cultivadas em 500 ml de meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de glucose e suplementado com 20 mg/l de cada um de leucina, adenina e histidina, e com 4 mg/l de ácido aminolevulínico a 30°C, num balão agitado até à fase logarítmica. As células foram depois colhidas, lavadas com meio sem uracilo e contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de glucose e suplementado com 40 mg/l de cada um de leucina, adenina e histidina, e com 4 mg/l de ácido aminolevulínico, e usaram-se para inocular 2 l do meio sem uracilo num fermentador Braun Biostat E. O pH foi mantido a pH 5,5 com uma solução de hidróxido de amónio a 5%. A  $pO_2$  foi mantida a 80% de saturação, durante a fase de crescimento, e depois ajustada a 10% após a glucose ter sido consumida. A velocidade do agitador foi ajustada a 500 rpm e depois reduzida para 100 rpm, na altura da indução. Colheram-se amostras de 2 em 2 horas após a glucose ter sido consumida, durante um período de cinquenta horas.

#### 10.6. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DO MUTANTE DE DELEÇÃO DE ALFA-GLOBINA EXPRESSA

O mutante de deleção de alfa-globina expresso foi quantificado por análise de mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6 supra. Os resultados indicaram que até 0,74% da proteína de levedura total, expressa nas células Sc1012, transformadas, era o mutante de deleção de alfa-globina.

#### 11.0. EXEMPLO 6: EXPRESSÃO DE UM MUTANTE DE DELEÇÃO DE ALFA-GLOBINA NUM VECTOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA CONTENDO UM PROMOTOR HÍBRIDO E UMA SEQUÊNCIA DE TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GAL10

Construiu-se um promotor híbrido pela fusão da sequência activadora a montante do promotor GAL10 com elementos do promotor a jusante do promotor IDH3 (aqui depois designado por extremidade



3' do promotor IDH3 ou IDH3-3'). Especificamente, clonaram-se o promotor híbrido GAL10-UAS-IDH3-3', o ADN de alfa-globina contendo uma deleção de nucleótido 34-37 que codifica alfa-12 alalina e o terminador GAL10; no plasmideo pUC19. O plasmideo resultante foi designado por pUC19-GH $\alpha$ Gt. Excisou-se a "cassette" contendo o promotor híbrido + ADN de alfa-globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina + terminador GAL10 e clonou-se no vector de vaivem de levedura, pPM40. Transformaram-se células de levedura da estirpe Sc1041 com o plasmideo resultante, pNM-R-G- $\alpha$ 1 e analisaram-se as proteínas expressas por análise de mancha Western.

#### 11.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN ligase-T4 foram obtidas de New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. O ADN de plasmideo foi isolado a partir de uma cultura de um litro das células de E. coli transformadas e purificado por centrifugação em gradiente de CsCl.

#### 11.2. CONSTRUÇÃO DO pUC19-GH $\alpha$ Gt

O pUC19-GH $\alpha$ Gt foi construído usando o procedimento que se descreve na Secção 10.2 supra.

#### 11.3. CLONAGEM DA CASSETTE GH $\alpha$ Gt no pPM40

A "cassette" de expressão, GH $\alpha$ Gt foi excisada por corte do ADN de plasmideo pUC19-GH $\alpha$ Gt com SacI/SphI e preencheram-se as suas extremidades. O fragmento resultante de 1,3 kb foi clonado no pPM40, de extremidades preenchidas, cortado com BamHI (ver Figura 31 onde se mostra o mapa de pPM40). O plasmideo resultante foi designado por pNM-R-G- $\alpha$ 1. Na Figura 33 mostra-se o mapa deste plasmideo.

#### 11.4 TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1041 com pNM-R-G- $\alpha$ 1

A Sc1041 tem o genótipo seguinte: MATa, leu2, ura3-52, trp(d)63, prb1-112, pep4-3, pro1-407, GAL2+. Transformou-se a levedura da estirpe Sc1041 com o plasmideo pNM-R-G- $\alpha$ 1 usando o procedimento esferoplasto (Rose, M. et al., 1989, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

N.Y., pp 112-115).

Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em 500 ml de meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de ácido láctico, 3% de glicerol, e suplementado com 20 mg/l de, cada um, triptofano e leucina, a 30°C, num balão agitado, até à fase logaritmica. As células foram depois colhidas, lavadas com meio sem uracilo contendo 0,67% de base de azoto e levedura, 2% de ácido láctico e 3% de glicerol e suplementado com 20 mg/l de triptofano, e usaram-se para inocular 500 ml do meio desprovido de uracilo. A cultura foi incubada com agitação (300 rpm) a 30°C, e desenvolvida até à fase semi-logaritmica antes da adição de galactose até uma concentração final de 1%. Quatro horas após a indução recolheram-se amostras para análise.

#### 11.5. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA ALFA-GLOBINA EXPRESSA MUTANTE DE DELECCÃO

O mutante de deleccão de alfa-globina expresso foi quantificado por análise de mancha Western usando procedimentos descritos na Secção 6.6 *supra*. Observaram-se níveis detectáveis de mutante de deleccão de alfa-globina.

#### 12.0. EXEMPLO 7: CO-EXPRESSÃO DE MUTANTE DE DELECCÃO DE ALFA-GLOBINA E DE BETA-GLOBINA NUMA LEVEDURA POR CO-TRANS- FORMAÇÃO

##### 12.1. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1041 COM pNM-R-G- $\alpha$ 1 e pNML-V-G-1

A Sc1041 tem o genótipo seguinte: MATa, leu2, ura3-52, trp(d)63, prb1-112, pep4-3, prc1-407, GAL2+. A estirpe de levedura Sc1041 foi co-transformada com o plasmídeo pNM-R-G- $\alpha$ 1 (*supra*, 11.3) e pNML-V-G-1 (*supra* 7.5) usando o procedimento da esferoplasto (Rose, M. et al., 1989, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 112-115).

Para a cultura de partida as células foram desenvolvidas em 500 ml de meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de ácido láctico, 3% de glicerol, 1% de rafinose e suplementado com 20 mg/l de triptofano a 30°C, num balão agitado até à

fase logarítmica. Colheram-se depois as células, lavaram-se com meio isento de leucina e uracilo, contendo 0,67% de base de azoto e levedura, 2% de ácido láctico e 3% de glicerol, e suplementado com 40 mg/l de triptofano e usaram-se para inocular 1700 ml do meio isento de leucina e de uracilo, num fermentador Braun Biostat E. O pH foi mantido a 5,0; a  $pO_2$  foi mantida a 30%; a velocidade do agitador foi mantida a 300 rpm. A cultura foi induzida com galactose a uma velocidade de 0,05% por hora. Recolheram-se amostras em determinados intervalos para análise.

#### 12.2. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos da Secção 6.6. Observaram-se níveis detectáveis de globina (0,2% de proteína solúvel).

#### 12.3. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DAS GLOBINAS ALFA E BETA EXPRESSAS

As globinas alfa e beta expressas foram separadas e quantificadas usando um gel de SDS-poliacríamida a 18%.

As amostras de levedura descongeladas (0,2 g de peso húmido), adicionou-se solução salina tamponada com fosfato (PBS NaCl 0,9 M, fosfato 0,01 M, pH 7,6) (2 ml). Centrifugaram-se as amostras a 4°C durante 10 minutos a 2700 rpm, num equipamento Sorvall RT6000B e decantou-se o sobrenadante. Ao sedimento adicionou-se tampão de disrupção frio (tris 50 mM, EDTA 5 mM, 0,5 mM PMSF, pH 8,0) preparado imediatamente antes do uso (0,2 ml), seguindo-se a adição de pérolas de vidro arrefecidas em gelo, em quantidade suficiente para apenas atingir a superfície superior do líquido. Após a agitação, num sistema de vórtice durante 30 segundos à velocidade máxima, colocaram-se as amostras em gelo durante 5 minutos. Este passo foi repetido duas vezes. A cada amostra adicionou-se tampão de disrupção arrefecido em gelo (1 ml) e transferiu-se o homogeneizado para um tubo Eppendorf. Noutro tubo Eppendorf, combinaram-se 200 µl de homogeneizado com 200 µl de tampão de amostra 2 X, descontínuo, padrão, recentemente preparado (Laemmli, 1970, Nature 227:680-685) e ferveu-se a amostra durante 10 minutos.

Após centrifugação das amostras durante 10 minutos, carregaram-se as amostras num gel desnaturante descontinuo, com 20 x 18 cm no qual o gel de empacotamento era a acrilamida a 3% e um gel de separação era acrilamida a 18% (Laemli, 1970, Nature 227: 680-685). Os geles foram usados a uma corrente constante de 15 mA por gel.

Após a electroforese estar completa e a banda corada ter atingido o fundo do gel de separação, removeram-se os geles da unidade de electroforese e colocaram-se as placas em separado sob água corrente desionizada. Descarregou-se o gel de empacotamento e separou-se o gel inferior da placa. Encheu-se a unidade de transferência com tampão de transferência (2 l de metanol, 30,3 g de base Tris, 144 g de glicina num volume final de 10 l, pH 8,3), e colocaram-se 2 l do tampão de transferência num recipiente pouco profundo. A sanduiche de transferência, consistindo de gaze de poros largos, papel de mancha 3M, o gel, um pedaço de papel de nitrocelulose, pré-cortado para cobrir apenas o gel, papel de mancha 3M e outro bocado de gaze de poros largos, foi montada sob o tampão no recipiente pouco profundo.

A proteína foi transferida do gel para o papel de nitrocelulose, por aplicação de uma voltagem de 40 V durante 1,5 horas. Após a transferência estar completa, removeu-se a nitrocelulose e colocou-se num recipiente pouco profundo com 50 ml de solução bloqueante [5% (p/v) BSA em PBS]. A membrana de nitrocelulose foi incubada durante uma hora com agitação, após o que se substituiu a solução bloqueante com solução de lavagem [0,1% de Tween 20 (v/v) em PBS]. Realizaram-se três lavagens de 15,5 e 5 minutos. Descarregou-se a solução final de lavagem e adicionaram-se ao recipiente 25 µl de anticorpo primário em 25 ml de PBS. Após incubação durante duas horas com agitação, lavou-se a nitrocelulose três vezes (1 x 15 e 2 x 5 minutos). Descarregou-se a solução de lavagem final e adicionaram-se 2,5 µl de anti-corpo secundário em 25 ml de PBS, durante uma hora de incubação com agitação. Após 3 lavagens (1 x 15 e 2 x 5 minutos), adicionaram-se 5 µl de estreptavidina-HRP (peroxidase de rábano) em 25 ml de PBS, contendo 0,1% de Tween 20 (v/v). Após uma incubação de 20 minutos com agi-

tação, lavou-se a membrana 3 vezes (1 x 15 e 2 x 5 minutos). Depois colocou-se a nitrocelulose em solução de revelação ECL (quimioluminescência melhorada) que tinha sido preparada imediatamente antes do uso, por mistura de volumes iguais de reagente de detecção 1 e de reagente de detecção 2 (Amersham). A membrana foi incubada durante 1 minuto com agitação, removida da solução de revelação, drenou-se o reagente em excesso e depois embrulhou-se a membrana em Saran Wrap. A nitrocelulose embrulhada foi depois exposta a película de raios X durante um período de tempo apropriado. Após a revelação analisou-se a película de raios X usando um densitómetro laser e estimou-se a quantidade de globina em cada amostra, por comparação de padrões de globina eluídos no mesmo gel.

Separaram-se as globinas alfa e beta neste gel por peso molecular. As globinas alfa e beta foram detectadas em extractos de proteína da levedura co-transformada.

#### 12.4. ESPECTROS Soret DA HEMOGLOBINA EM LEVEDURA

O anel porfirina que se encontra na hemoglobina funcional é responsável pela capacidade da molécula em ligar reversivelmente o oxigénio. Adicionalmente, as muitas ligações duplas do anel resultam em a hemoglobina ser capaz de absorver luz na gama de 200 a 600 nm (ultravioleta a visível). Os comprimentos de onda exactos de absorvância máxima (i.e. picos) são função de vários factores que incluem a estrutura exacta do anel, a proteína com a qual o anel está associado (p.e., hemoglobina, mioglobina, citocromos, etc.), diferenças no ambiente próximo do anel numa dada proteína (p.e. HbA<sub>0</sub> versus HbA<sub>0</sub>O<sub>2</sub>, etc) e de pequenas moléculas inorgânicas ligadas ao anel (p.e. oxigénio, monóxido de carbono, óxido nítrico, etc). Os picos de absorvância da hemoglobina na gama dos 415 a 430 nm são particularmente intensos e podem ser usados para detectar a presença da hemoglobina. Esta região é designada por região Soret e as absorvâncias da hemoglobina nesta região são designadas por bandas Soret. A presença de HbA pode ser confirmada pelo desvio na Banda Soret observado quando o CO elimina O<sub>2</sub>. Neste caso, a banda Soret desvia-se de 415 para 419 nm.

Suspenderam-se as células de levedura em tampão Tris, pH 7,5 a 25°C. O espectro Soret foi analisado inicialmente, seguindo-se a exposição a monóxido de carbono (3-4 minutos) e redução com solução de ditionito (20 mM em tampão saturado com azoto). O espectro Soret indicou a absorvância na região de 416-418 nm que é característica da hemoglobina e que não está presente em levedura de controlo que não exprime globinas.

### 13.0. EXEMPLO 8: CO-EXPRESSÃO DE UM MUTANTE DE DELEÇÃO DE ALFA-GLOBINA E BETA-GLOBINA USANDO UM PLASMÍDEO DE "CAS-SETTE" DUPLA

Construíram-se dois plasmídeos de co-expressão usando a estratégia da "cassette" dupla. Clonaram-se duas "cassettes" de expressão separadas, uma contendo o ADN de  $\alpha$ -globina humana, contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alalina e a outra contendo ADN da  $\beta$ -globina, em dois sítios únicos num único vector de levedura. Os plasmídeos resultantes pBM-V-X1-G- $\alpha\beta$  (orientação directa) e pBM-V-X2-G- $\alpha\beta$  (orientação oposta) contêm o ADN de  $\alpha$ -globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina e  $\beta$ -globina sob o controlo de dois promotores separados (idênticos). Transformaram-se células de levedura Sc1115 com o plasmídeo pBM-V-X2-G- $\alpha\beta$ , cultivaram-se e induziram-se com galactose. A levedura transformada com esta "cassette" dupla produziu HbA funcional.

#### 13.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN-ligase T4 foram obtidas em New England Biolabs (Biolabs, Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. O ADN de plasmídeo foi isolado a partir de uma cultura de um litro das células transformadas e purificado por centrifugação em gradiente de CsCl.

#### 13.2. CLONAGEM DE pBM-V-X1-G- $\alpha\beta$ e pBM-V-X2-G- $\alpha\beta$

A construção do plasmídeo pNML-V-G-1 foi realizada como se descreveu na secção 7.5 supra. O plasmídeo pNML-V-G-1 contém a "cassette" de expressão, o promotor híbrido GAL-10-UAS-TDH3-3', o gene da  $\beta$ -globina e o terminador ADHI (GHBAT) que foi clonado no sítio BamHI do vector de expressão de levedura, YEp13. O plasmí-

deo pUC19-GH $\alpha$ Gt (Secção 10.2, supra) contém o mesmo promotor híbrido, o ADN de  $\alpha$ -globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina e o terminador GAL10. Esta "cassette" de expressão foi designada por GH $\alpha$ Gt.

O ADN do plasmídeo pNML-V-G-1 foi digerido com PvuII e o ADN linear foi isolado por electroeluição e desfosforilado (fragmento 1). Cortou-se o ADN do plasmídeo pUC19-GH $\alpha$ Gt com SacI/SphI e isolou-se o fragmento de 1,3 kb resultante, contendo a "cassette" GH $\alpha$ Gt, e preencheram-se as suas extremidades (fragmento 2). Introduziu-se uma ligação entre os fragmentos 1 e 2. Usaram-se células de *E. Coli* Sure para transformação e isolaram-se os transformantes em placas de selecção de ampicilina.

Isolou-se o ADN de 48 transformantes por lise alcalina e analisou-se por digestão com enzima ApaLI.

Os clones positivos contendo todos os fragmentos foram ainda analisados por digestões com enzimas de restrição. Os plasmídeos contendo ambas as "cassettes" de expressão no vector de levedura YEp13 foram designados por pBM-V-X1-G- $\alpha\beta$  e pBM-V-X2-G- $\alpha\beta$ . O X1 refere-se à orientação segundo a qual ambas as "cassettes" são transcritas na mesma direcção e X2 refere-se à orientação oposta.

A Figura 34 descreve a estratégia usada para a clonação da "cassette" GH $\alpha$ Gt num vector de levedura contendo a "cassette" de expressão GH $\beta$ At.

### 13.3. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1115 COM pBM-V-X1-G- $\alpha\beta$ e pBM-V-X2-G- $\alpha\beta$

A Sc1115 tem o genótipo seguinte: MATa, leu2-3,112; his3-115, Can<sup>R</sup>. Transformou-se a estirpe de levedura Sc1115 com o plasmídeo pBM-V-X1- $\alpha\beta$  (1115X1Galb1) ou pBM-V-X2- $\alpha\beta$  (1115X2VGalb1) usando o procedimento de electroporação.

Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em 500 ml de meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de ácido láctico, 3% de glicerol, 1% de rafinose, e

suplementado com 20 mg/l de histidina a 30°C num balão agitado, até à fase logarítmica. Colheram-se depois as células, lavaram-se com meio isento de leucina contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de ácido láctico e 3% de glicerol, e suplementado com 40 mg/l de histidina e usaram-se para inocular 1700 ml de meio isento de leucina num fermentador Braun Biostat E. O pH foi mantido a 5,0; a  $pO_2$  foi mantida a 30%; a velocidade do agitador foi mantida a 300 rpm. A cultura foi induzida com galactose a uma velocidade de 0,05% por hora. Recolheram-se amostras em determinados intervalos para análise.

#### 13.4. ANÁLISE POR MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6. Observaram-se níveis detectáveis de globina (1% da proteína solúvel total).

#### 13.5. ANÁLISE POR MANCHA WESTERN DAS GLOBINAS ALFA E BETA EXPRESSAS

Separaram-se as globinas alfa e beta expressas e quantificaram-se usando um gel de SDS poliacrilamida a 18% (supra 12.4). Observaram-se níveis detectáveis de ambas as globinas alfa e beta.

#### 13.6. ESPECTROS Soret DA HEMOGLOBINA EM LEVEDURA

O espectro Soret (12.5 supra) indicou absorvância na região de 418 nm, que é característica da hemoglobina, e que não está presente na levedura de controlo que não exprime globinas. Detectou-se uma concentração de heme de 5  $\mu$ M.

#### 14.0. EXEMPLO 9: CO-EXPRESSÃO DE MUTANTE DE DELECÇÃO DE ALFA-GLOBINA E GAMA<sub>val</sub> USANDO UM PLASMÍDEO DE "CASSETTE" DUPLA

Construíram-se dois plasmídeos de co-expressão usando a estratégia da "cassette" dupla. Clonaram-se duas "cassettes" de expressão separadas, uma contendo o ADN de  $\alpha$ -globina humana contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alanina e a outra contendo ADN da (val)globina em dois sítios únicos num único vector de levedura. Os plasmídeos resultantes pBM-R-X7-A- $\alpha$  val (orientação directa) e pBM-R-X8-A- $\alpha$  val

(orientação oposta) contêm ambos os genes da  $\alpha$ -globina e da (val) globina sob o controlo de dois promotores separados.

#### 14.1. MATERIAIS

As enzimas de restrição, a enzima Klenow e a ADN-ligase T4 foram obtidas em New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Boehringer Mannheim (BM). Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores. Isolou-se o ADN de plasmídeo a partir de uma cultura de um litro das células transformadas e purificou-se por centrifugação em gradiente de CsCl.

#### 14.2. CLONAGEM DOS PLASMÍDEOS pBM-R-X7-A- $\alpha$ val e pBM-R-X8-A- $\alpha$ val

O plasmídeo pNM-R-A- $\alpha$ 1 (Secção 10.4, *supra*) contém a "cassette" de expressão, o promotor híbrido ADH2-UAS-IDH3-3', o ADN de  $\alpha$ -globina contendo uma deleção de nucleótidos 34-37 que codifica alfa-12 alaninae o terminador GAL10 (AH $\alpha$ Gt), que foi clonada no sítio BamHI do vector de expressão de levedura, pPM40. A Figura 36 descreve a estratégia usada para a clonagem da "cassette" AH valAt no plasmídeo da expressão de levedura pNM-R-A- $\alpha$ 1. As "cassettes" duplas resultantes foram designadas por pBM-R-X7-A- $\alpha$  val (orientação directa) e pBM-R-X8-A- $\alpha$  val (orientação oposta).

##### 14.2.1. CLONAGEM DO PLASMÍDEO pUC19-AH valAt

O plasmídeo pUC19-AH valAt contém o promotor híbrido ADH2-UAS-IDH3-3' e o gene da val-globina e o terminador ADH. Esta "cassette" de expressão foi designada por AH valAt.

##### 14.2.1.1. CONSTRUÇÃO DO pUC19-AHBAt

O fragmento de ADN ADH2-UAS foi gerado por PCR. O ADN genómico foi isolado a partir da estirpe de levedura S173-6B. Na Figura 37 mostram-se os iniciadores 5' e 3', usados para a síntese do fragmento de ADN ADH2-UAS.

Isolou-se o fragmento ADH2-UAS resultante (200 pb), por electroeluição e cortou-se com SacI (extremidade 5') e com XbaI (extremidade 3') e clonou-se com pUC19, cortado com SacI e XbaI. Usou-se a mistura de ligação para transformar células *E. coli* com-

petentes e isolou-se o ADN de 24 transformantes por digestão alcalina. As amostras de ADN dos clones foram analisadas usando as enzimas apropriadas e o plasmídeo resultante foi designado por pUC19-ADH2-UAS. Na Figura 38 mostra-se o mapa deste plasmídeo. O ADN do plasmídeo pUC19-ADH2-UAS foi cortado com XbaI/SphI. Isolou-se o fragmento de ADN linear (fragmento #1).

A PCR foi realizada usando ADN do plasmídeo pUC19-GHBat, como molde. Na Figura 39 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese da sequência. O fragmento de 1,1 kb resultante foi designado por HBAat (fragmento #2). O fragmento de 1,1 kb resultante, contendo IDH3-3'-gene da beta-globina-terminador ADH1 (HBAat) foi cortado com XbaI/SphI (fragmento #2).

Introduziu-se uma ligação entre os fragmentos #1 e #2. Transformaram-se células E.coli DH5 $\alpha$  e o ADN dos transformantes foi analisado usando as enzimas apropriadas. O plasmídeo contendo os fragmentos na orientação correcta foi designado por pUC19-AHBAat.

#### 14.2.1.2. CLONAGEM DA GAMA(VAL)-GLOBINA NO pUC19-AHBAat

Usando os iniciadores apropriados e ADN do plasmídeo YEp51TG, sintetizou-se gama(val)-globina, contendo o terminador ADH, por PCR. Na Figura 21 mostram-se os iniciadores 5' e 3', usados para a síntese da sequência. Cortou-se o fragmento de PCR com ApaI e SphI (fragmento #1). Cortou-se o ADN do plasmídeo pUC19 com SacI/SphI e isolou-se o fragmento de ADN linear (fragmento #2). Cortou-se o ADN do plasmídeo pUC19-AHBAat (14.2.1.1 supra) com ApaI e SacI, e o fragmento de 360 pb contendo o promotor híbrido ADH2-UAS-IDH3-3' foi isolado por electroeluição (fragmento #3).

Introduziu-se uma ligação de três vias entre os três fragmentos anteriores. Para a transformação usaram-se células de E.coli DH5 $\alpha$ . O ADN de 24 transformantes foi isolado por digestões alcalinas e analisado por digestões de restrição. O plasmídeo resultante, contendo todos os fragmentos na orientação correcta, foi designado por pUC19-AH $\gamma_{val}$ At; Na Figura 40 mostra-se o mapa deste plasmídeo.

#### 14.2.2. CLONAGEM DA "CASSETTE" AH<sub>val</sub>AT NO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA pNM-R-A- $\alpha$ 1

A Figura 36 descreve a estratégia usada para a clonagem da "cassette" AH<sub>val</sub>AT no plasmídeo de expressão de levedura pNM-R-A- $\alpha$ 1.

Digeriu-se o ADN do plasmídeo pNM-R-A- $\alpha$ 1 (ver Secção 10 supra) com PvuII e isolou-se o ADN linear por electroeluição e desfoforilou-se (fragmento 1). Cortou-se o ADN do plasmídeo pUC19-AH<sub>val</sub>AT com SacI/SphI e isolou-se o fragmento de 1,3 kb resultante, contendo a "cassette" AH<sub>val</sub>AT, e preencheram-se as suas extremidades (fragmento 2). Introduziu-se uma ligação entre os fragmentos 1 e 2. Usaram-se células E.coli Sure para transformação e isolaram-se os transformantes em placas de selecção de ampicilina. Isolou-se o ADN de 48 transformantes por lise alcalina e analisou-se por digestão com enzima ApaI.

Os clones positivos contendo todos os fragmentos foram ainda analisados por digestões com enzimas de restrição. Os plasmídeos contendo ambas as "cassettes" de expressão no vector de levedura pPM40 (ver Figura 31) foram designados por pBM-R-X7-A- $\alpha$  val (orientação directa) e pBM-R-X8- $\alpha$  val (orientação oposta).

Transformou-se levedura da estirpe Sc1113 com plasmídeo pBM-R-X8-A- $\alpha$  val (1113x8VGalgVAL1) usando o procedimento de esferoplasto. Para a cultura de partida desenvolveram-se as células em 500 ml de meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de ácido láctico, 3% de glicerol, 1% rafinose, e suplementado com 20 mg/l de histidina a 30°C, num balão agitado até à fase logarítmica. Colheram-se depois as células, lavaram-se com meio isento de leucina, contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 2% de ácido láctico e 3% de glicerol, e suplementado com 40 mg/l de histidina, e usou-se para inocular 1700 ml do meio isento de leucina no fermentador Braun Biostat E. O pH foi ajustado a 6,93. Desenvolveu-se a cultura até à exaustão da glucose e recolheram-se amostras entre 1 e 30 horas após a exaustão, para análise.

As proteínas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. Detectou-se globina a um nível de 0,03% de proteína solúvel.

#### 15.0. EXEMPLO 10: EXPRESSÃO DE GLOBINAS VARIANTES

Os genes da globina mutante foram clonados no vector de expressão de levedura YEp51NT1. Este vector contém sequências de promotor GAL10 e de terminador ADH. Neste vector de expressão de levedura clonaram-se os genes mutantes seguintes:

- |       |                        |               |
|-------|------------------------|---------------|
| i.    | $\beta$ -Chico         | (66 Lys→Thr)  |
| ii.   | $\beta$ -Rainier       | (145 Tyr→Cys) |
| iii.  | $\beta$ -Ta Li         | (83 Gly→Cys)  |
| v.    | $\beta$ -Motown        | (127 Gln→Glu) |
| vi.   | $\alpha$ -Titusville   | (94 Asp→Asn)  |
| vii.  | $\alpha$ -104 Ser      | (104 Cys→Ser) |
| viii. | $\gamma$ -Porto Alegre | (9 Ala→Cys)   |
| ix.   | $\gamma$ -Chico        | (66 Lys→Thr)  |
| x.    | $\delta$ -Titusville   | (94 Asp→Asn)  |
| xi.   | $\beta$ -Mississippi   | (44 Ser→Cys)  |

#### 15.1. MATERIAIS E MÉTODOS

As enzimas de restrição e as enzimas de modificação de ADN foram obtidas em Boehringer-Mannheim, Bethesda Research Laboratories, Perkin-Elmer ou New England Biolabs. Todas as enzimas foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores.

Os oligonucleótidos usados na reacção em cadeia com polimerase (PCR) foram obtidos por síntese química num sintetizador da ADN da Applied Biosystems 380B.

A estirpe de E.Coli usada para todas as transformações bacterianas foi a estirpe DH5 $\alpha$ .

##### 15.1.1. ISOLAMENTO DO FRAGMENTO DE ADN

Todos os fragmentos de ADN foram separados num gel de agarose (TBE 1X) e isolados por electroeluição usando um electroeluidor Pharmacia.

#### 15.1.2. LIGAÇÃO DE ADN E TRANSFORMAÇÃO DE E.COLI

Todas as ligações de ADN foram realizadas usando procedimentos de ligação convencionais ("Laboratory Cloning: A Laboratory Manual"; Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Second Edition pp: 1.631.71) e a transformação de E.Coli foi realizada usando procedimentos de transformação convencionais ("Laboratory Cloning: A Laboratory Manual"; Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, Second Edition pp: 1.741.84). Colocaram-se as células transformadas em placas de meio LB com 100 mg/l de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C de um dia para o outro. Usaram-se as colônias que se formaram sobre estas placas para inocular 5,0 ml de meio LB com 100 mg/l de ampicilina e desenvolveram-se as culturas a 37°C de um dia para o outro.

#### 15.1.3. ANÁLISE DO ADN DE PLASMÍDEO

O ADN foi isolado a partir de 1,5 ml da cultura de um dia para o outro, usando o procedimento de lise alcalina. O ADN de plasmídeo foi analisado por digestão com as enzimas de restrição apropriadas.

#### 15.1.4. TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURA

A transformação de levedura foi realizada usando os procedimentos publicados (Hinnen, A., Hicks, J. B. e Fink, G. R. (1978) Transformation in Yeast, Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A. 75, 1929-1933).

#### 15.2. SÍNTESE DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Sintetizaram-se vários oligonucleótidos como um passo preliminar na construção de várias variantes do gene da beta-globina. Os oligonucleótidos a ser usados no procedimento de mutagenese in vitro, com M13, foram sintetizados e purificados. A electroforese em gel de poliacrilamida, após a quinase, demonstrou que a síntese era eficaz e que os oligonucleótidos estavam prontos para ser usados no sistema M13.



Os oligonucleótidos seguintes Mu-14SCy, Mu-66Th, e Mu-9Cy foram sintetizados num sintetizador de ADN da Applied Biosystems. As letras a cheio na sequência indicam uma modificação da sequência do gene da beta-globina do tipo selvagem (ver Figura 41). Após a síntese e incubação a 65°C, os oligonucleótidos foram purificados usando colunas de purificação de oligonucleótidos (ABI). Os oligonucleótidos purificados foram liofilizados e suspensos em 100 µl de água e a concentração foi determinada pelo valor de OD<sub>260</sub>.

Usaram-se aproximadamente 100 ng do ADN sintético numa reacção de quinase para determinar a eficiência da síntese. Os oligonucleótidos de quinase [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP foram analisados num gel de sequenciação de acrilamida a 6% contendo ureia 7M. O corante usado nesta electroforese era uma mistura de azul de bromofenol e de xino-cinol que se separa durante o procedimento, possuindo cada corante uma velocidade de migração diferente. A auto-radiografia foi realizada após a secagem do gel.

Após a auto-radiografia do gel de sequenciação, os resultados indicaram que a síntese foi eficaz, uma vez que a maior parte da radioactividade tinha sido incorporada nas bandas mais largas que se moveram entre as duas frentes de corante. Sob as condições de electroforese que anteriormente se descreveram, os fragmentos que têm aproximadamente 25 bases deverão migrar com a frente de corante azul de bromofenol, enquanto que os que possuem cerca de 90 bases deverão migrar com a frente de corante xino-cinol. Os oligonucleótidos tinham uma dimensão compreendida entre 30 e 45 bases que deveriam evoluir entre as duas frentes de corante tal como se observou.

### 15.3. MUTAGÉNESE IN VITRO

O conjunto de mutagenese in vitro da Bio Rad proporciona os componentes necessários para a mutagenese com o sistema M13. Neste conjunto incluem-se duas estirpes de E.coli para usar no processo. A estirpe de E.coli CJ236 contém mutações que resultam na incorporação de uracilo em vez de timina no ADN. A estirpe de E.coli MV1190 é uma estirpe do tipo selvagem que é usada para



produzir ADN de cadeia simples após a mutagénese.

#### 15.3.1. ESTIRPES

As estirpes de *E.coli* que foram recebidas no conjunto de mutagénese foram sub-cultivadas num meio apropriado de acordo com os marcadores genéticos para selecção. Os constituintes de cada tipo de meio bem como um protocolo sugerido para a mutagénese podem ser encontrados com a brochura incluída no conjunto de mutagénese (New England BioLabs, "M13 Cloning and Sequencing System - A Laboratory Manual").

#### 15.3.2. TRANSFECCÃO DE CJ236

As células CJ236 competentes, para uso na transfecção, foram preparadas inoculando 100 ml de caldo LB, contendo cloranfenicol, com 50 ml de uma cultura, de um dia para o outro, de CJ236. A cultura foi incubada a 37°C num agitador arejado até o valor de  $DO_{600}$  atingir 0,8. As células foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, ressuspenderam-se em 20 ml de solução de  $CaCl_2$  50 mM, fria, e mantiveram-se em gelo durante 30 minutos. Centrifugaram-se de novo as células e ressuspenderam-se em 4 ml de solução de  $CaCl_2$  50 mM.

As células CJ236 competentes foram transfectadas com M13mp-19BHS adicionando 1 µl ou 5 µl de ADN a 0,3 ml de células competentes. Mantiveram-se os tubos em gelo durante 40 minutos, submeteram-se a um choque térmico, a 42°C durante 3 minutos e adicionaram-se os conteúdos a 4 ml de ágar de topo (50°C) contendo cloranfenicol e 300 µl da cultura, de um dia para o outro, de CJ236. Este ágar de topo, foi vertido sobre placas de meio H contendo cloranfenicol e incubou-se de um dia para o outro a 37°C. O fago foi isolado (a partir das células infectadas) tocando a placa com um palito e suspendendo as células assim recolhidas em 0,5 ml de TE.

#### 15.3.3. ISOLAMENTO DO ADN CONTENDO URACILO

O ADN contendo uracilo foi isolado a partir de CJ236 inoculando 5 ml de meio LB, contendo cloranfenicol, com 1,0 ml de uma cultura de um dia para o outro de CJ236. A cultura foi incubada a

37°C, com agitação, até atingir um valor de  $DO_{600}$  de 0,3. Nesta altura, infectou-se a cultura com 50  $\mu$ l de uma cultura de reserva a -70°C, que tinha sido previamente infectada com o fago, de modo a amplificar a produção de ADN de cadeia simples. Deixou-se a cultura infectada crescer, de um dia para o outro nestas condições. No dia seguinte, centrifugaram-se 30 ml da cultura a 16 000 rpm durante 15 minutos. Transferiu-se o sobrenadante contendo as partículas de fago para um novo tubo e centrifugou-se uma segunda vez. Tratou-se o sobrenadante desta segunda centrifugação com 150 mg de RNase A, à temperatura ambiente durante 30 minutos. Precipitou-se o ADN de cadeia simples adicionando 7,5 ml de solução de PEG (acetato de amónio 3,5 M, 20% de PEG 8000) e manteve-se em gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se o tubo e rejeitou-se o sobrenadante. Suspendeu-se o sedimento em 200  $\mu$ l de tampão de elevado teor em sais (NaCl 300 mM, Tris 100 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), manteve-se em gelo durante 30 minutos e centrifugou-se numa centrifugadora durante 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

O fago foi titulado sobre CJ236 e MV1190 para determinar se a infecção tinha ou não sido produtiva. Após confirmação da infecção produtiva, extraiu-se o ADN com um volume igual de fenol, um volume igual de fenol-clorofórmio e com um volume igual de éter. O ADN extraído foi precipitado com um volume 1/10 de acetato de amónio 7,8 M e com 2,5 volumes de etanol, a -20°C, de um dia para o outro. Centrifugou-se o tubo durante 15 minutos e ressuspendeu-se o sedimento em 20  $\mu$ l de TE. Este ADN é o ADN contendo uracilo, de cadeia simples, que foi usado como molde para a síntese da cadeia mutagénica.

#### 15.3.4. QUINASE DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Os oligonucleótidos purificados foram quinasados tratando 5  $\mu$ g de cada um dos seis oligonucleótidos com polinucleótido-quinase T4 e ATP para assegurar a ligação eficiente das duas extremidades da cadeia de ADN, recentemente sintetizada.

#### 15.3.5. SÍNTESE DA CADEIA MUTAGÉNICA

A síntese da cadeia mutagénica foi realizada adicionando



0,25 µg (0,1 pM) do molde de ADN, de cadeia simples, contendo uracilo, e 0,03 µg (3 pM) de cada um dos iniciadores de oligonucleótido sintéticos. O iniciador foi temperado com o molde de cadeia simples (volume final da mistura reaccional, 10 ml) em tampão de têmpera 1X (Tris-HCl 2 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM, NaCl 5 mM) num banho de água com uma temperatura inicial de 70°C que se deixou arrefecer até 30°C. Depois, colocaram-se as misturas reacionais num banho de água-gelo e, a cada mistura, adicionaram-se os componentes seguintes: 1 µl de tampão de síntese 10X (concentração final = 0,4 mM em cada um dos dNTP, ATP 0,75 mM, Tris-HCl 17,5 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 3,75 mM, DTT 21,5 mM), 1 µl de ADN-ligase T4 (2-5 unidades) e 1 µl de ADN-polimerase T4 (1 unidade). Incubaram-se as misturas reacionais em gelo durante 5 minutos de modo a estabilizar o iniciador, por início da síntese de ADN sob condições que favorecem a ligação do iniciador ao molde. Depois, incubaram-se as misturas reacionais a 25°C durante 5 minutos e, finalmente, a 37°C durante 90 minutos. Após a incubação final, a cada mistura reaccional, adicionaram-se 90 µl de tampão de paragem (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM) e colocaram-se a -20°C até serem usadas na transfecção de MV1190.

#### 15.3.6. TRANSFECCÃO DE CÉLULAS MV1190

As células MV1190 foram transfectadas com os produtos das reacções de síntese, adicionando 3 µl e 9 µl de cada mistura reaccional a 0,3 ml de células competentes. Incubaram-se os tubos em gelo durante 90 minutos, submeteram-se a um choque térmico a 42°C durante 3 minutos e, depois, colocaram-se em gelo. Adicionaram-se 50 e 100 µl das células transfectadas a tubos, contendo 0,3 ml de uma cultura, de um dia para o outro, de MV1190, 50 µl de X-gal a 2%, 20 µl de IPTG 100 mM e 2,5 ml de ágar de topo (55°C). Agitou-se a mistura num agitador de vórtice e verteu-se sobre placas de ágar H. Incubaram-se as placas, de um dia para o outro a 37°C, e observaram-se, quanto à formação de plaquetas na manhã seguinte. As plaquetas que apareceram azuis não continham o inserido, enquanto que as que apareceram claras eram plaquetas com interesse.

#### 15.3.7. ANÁLISE DE TRANSFORMANTES POR SEQUENCIACÃO

As plaquetas claras foram recolhidas inserindo uma pipeta de Pasteur esterilizada no ágar e suspendendo a amostra recolhida em 3 µl de caldo LB (de entre cada uma das placas contendo plaquetas escolheram-se 24 plaquetas). Adicionaram-se 100 ml de uma cultura, de um dia para o outro, de MV1190 e incubaram-se os tubos, com agitação, de um dia para o outro, a 37°C. Após o período de incubação, isolou-se ADN de cadeia simples a partir das culturas e usou-se este ADN em reacções de sequenciação.

Realizou-se a sequenciação de didesoxilo para confirmar a presença de mutações. O conjunto de sequenciação usado neste caso foi obtido na New England Biolabs. Cada mistura reaccional de sequenciação foi preparada usando 8 µl do ADN de cadeia simples a ser sequenciado, 1 µl do iniciador apropriado e 1 µl de tampão de sequenciação 10X. O iniciador foi temperado com o molde de cadeia simples, colocando os tubos a 90°C e deixando-os arrefecer até 30°C. Em cada mistura reaccional de sequenciação individual, usaram-se 2 µl da mistura de ADN-iniciador, conjuntamente com 2 µl da mistura de determinação (50 µl dos dNTP apropriados e ddNTP mais 5 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP) e com 2 µl da enzima Klenow diluída até 0,1 unidades/ml. Incubou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 15 minutos e adicionaram-se 2 µl de uma mistura de "chase", que consistia de uma mistura de dNTP contendo dATP e enzima Klenow frios. Incubou-se de novo, esta mistura reaccional à temperatura ambiente durante 15 minutos e adicionaram-se 4 µl de mistura corante para parar a reacção. Desnaturaram-se as amostras, por ebulição durante 2,5 minutos, e colocaram-se num banho de água-gelo e carregaram-se num gel de sequenciação de poliacrilamida a 6% contendo ureia 7 M. Processou-se o gel a 55 watt durante, aproximadamente, 4 horas antes de ser seco sob vácuo e colocado numa "cassette" de filme de raios-X para auto-radio-grafia.

Usaram-se outros conjuntos de sequenciação para obter os melhores resultados conjuntamente com [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP. Um conjunto de sequenciação, especificamente, para uso com ADN de cadeia simples, foi obtido da IBI e usou-se um conjunto Pharmacia com ADN-polimerase T7 em vez da enzima Klenow de modo a sequenciar os

mutantes para além do ponto da têmpera com o iniciador.

A transfecção de MV1190 com os produtos da reacção de síntese resultaram em plaquetas claras sobre as placas contendo ADN Mu66Th, Mu66Th67I e Mu145Cy, Mu40Th, e Mu66Ty. O controlo que foi incluído consistia de uma transfecção com ADN molde sem um iniciador para síntese da segunda cadeia. Este controlo revelou algumas plaquetas, mas em menor número do que quando se usou um iniciador para mutagénese.

#### 15.4. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO YEp51NT1

Modificou-se o vector de vaivém de levedura YEp51 de modo a ter sequências de terminador ADN. O terminador ADN foi inserido entre o promotor GAL10 e o 2  $\mu$  presentes neste vector. Especificamente, digeriu-se o plasmídeo YEp51 com a enzima de restrição Bcl 1. A molécula de ADN linearizada foi tratada com enzima Klenow e com dNTP de modo a preencher as suas extremidades. Ao plasmídeo de extremidades preenchidas ligou-se um oligonucleótido de cadeia dupla. Este oligonucleótido foi obtido de BRL e continha sequências para a enzima de restrição NotI. A ligação foi realizada de um dia para o outro à temperatura ambiente. O ADN da mistura reaccional de ligação foi precipitado usando polietilenoglicol (PEG). Este procedimento remove todos os oligonucleótidos não ligados, uma vez que apenas as grandes moléculas de ADN são precipitadas com PEG. Após a precipitação com PEG, limpou-se o ADN por extracção com fenol e precipitação com etanol. Digeriu-se o ADN de plasmídeo com NotI e HindIII.

O terminador ADH foi obtido a partir do plasmídeo AAH5 (ver figura 8). Digeriu-se o plasmídeo AAH5 com a enzima de restrição BamHI. Preencheram-se as extremidades do ADN com enzima Klenow e com dNTP. Submeteu-se o ADN de extremidades preenchidas a extracção com fenol e precipitação com etanol. Ligou-se o oligonucleótido de cadeia dupla, anteriormente referido, ao plasmídeo de extremidades preenchidas. A ligação foi realizada de um dia para o outro à temperatura ambiente. O ADN resultante da ligação foi precipitado usando polietilenoglicol (PEG). Após a precipitação com PEG, limpou-se o ADN por extracção com fenol e precipitação



com etanol. Depois digeriu-se o ADN com as enzimas de restrição NotI e HindIII. Isolou-se um fragmento NotI-HindIII de 400 pb a partir de um gel de agarose a 1,0% (TBE 1X). O ADN foi electro-eluído a partir da fatia de agarose e precipitado com etanol. Ligou-se este fragmento de ADN purificado ao plasmídeo anteriormente referido. Usou-se a mistura de ligação para transformar células DH5 $\alpha$ . Espalharam-se as células transformadas sobre placas contendo meio LB com 100 mg/l de ampicilina. Incubaram-se as placas de um dia para o outro a 37°C. Usaram-se as colónias que apareceram sobre estas placas para inocular 5 ml de meio LB contendo 100 mg/l de ampicilina. Desenvolveram-se as culturas a 37°C de um dia para o outro. O ADN foi isolado a partir de 1,5 ml da cultura de um dia para o outro usando o procedimento de lise alcalina. Digeriu-se o ADN de plasmídeo com as enzimas de restrição NotI e HindIII. Na Figura 42 mostra-se o plasmídeo resultante designado por YEp51NT1.

#### 15.5. CLONAGEM DE GLOBINAS VARIANTES

O vector para a clonagem do(s) gene(s) da  $\beta$ -globina mutado(s) foi preparado por digestão dos plasmídeos YEp51T/G (Secção 8.4, supra) ou YEp51NT1/ $\gamma$ -Port (15.5.5, infra) com SalI e HindIII. O vector para clonagem do gene da  $\gamma$ -globina foi o YEp51NT1. Esta digestão resulta em dois fragmentos (7300 e 500 pb); isolou-se o fragmento de 7300 pb.

##### 15.5.1. CLONAGEM DO GENE DA $\beta$ -GLOBINA CHICO (Lys 66 $\rightarrow$ Thr)

A  $\beta$ -globina Chico foi criada por mutagénese dirigida a sítios (supra, 15.2 e 15.3). Digeriu-se o gene da  $\beta$ -globina mutado com as enzimas de restrição SalI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 600 pb. Este fragmento de 600 pb, purificado, foi ligado ao vector YEp51NT1/ $\gamma$ -Port. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento do ADN foram realizadas como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas com as enzimas de restrição PstI e EcoRI. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que a maior parte dos clones analisados possuíam os fragmentos esperados (dois fragmentos quando digeridos com PstI e três fragmentos quando digeridos com EcoRI). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ $\beta$ -Chi-

co.

#### 15.5.2. CLONAGEM DO GENE DA B-GLOBINA RAINIER (Tyr 165 ->Cys)

A B-globina Rainier foi criada por uma mutagênese digerida a sítios (*supra*, 15.2 e 15.3). Digeriu-se o gene da B-globina, mutado, com as enzimas de restrição SalI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 600 pb. Este fragmento de 600 pb, purificado, foi ligado ao vector YEp51NT1/ -Port. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento do ADN foram realizadas como se descreveu (15.1, *supra*). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com as enzimas de restrição PstI e EcoRI. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que a maior parte dos clones analisados possuíam os fragmentos esperados (dois fragmentos quando digeridos com PstI e três fragmentos quando digeridos com EcoRI). Este plasmídeo foi designado por pNT1/B-Ran.

#### 15.5.3 CLONAGEM DO GENE DA B-GLOBINA TA LI (Gly 83 -> Cys)

A B-globina Ta Li foi criada por uma substituição de base usando PCR. O gene da globina foi isolado na forma de dois fragmentos. A extremidade 5' do gene (SalI e BamHI) foi obtida por PCR. Na Figura 43 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese da sequência.

Digeriu-se o fragmento mutado do gene da B-globina com SalI e BamHI. Este fragmento de ADN digerido foi purificado por extração com fenol e precipitação com etanol. A extremidade 3' do gene de B-globina foi isolada a partir do plasmídeo mp18BHS. O plasmídeo mp18BHS foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 300 pb. Ligou-se este fragmento de 300 pb purificado, conjuntamente com o fragmento obtido por PCR, ao vector YEp51NT1/ -Port. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento de ADN foram realizados como se descreveu (15.1, *supra*). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com a enzima de restrição PstI. Os resultados obtidos a partir destas análises mostraram que a maior parte dos clones analisados possuíam os fragmentos esperados (dois fragmentos quando digeridos com PstI três fragmentos a partir do

vector sem inserido). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ $\beta$ -Talis.

#### 15.5.4. CLONAGEM DO GENE DA $\beta$ -GLOBINA MOTOWN (Gln 127 $\rightarrow$ Glu)

A  $\beta$ -Globina Motown foi criada por uma substituição de base usando PCR. O gene da globina foi isolado na forma de dois fragmentos. A extremidade 3' do gene (EcoRI-HindIII) foi obtida por PCR. Na Figura 44 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese da sequência.

Digeriu-se o fragmento mutado do gene da  $\beta$ -globina, obtido por PCR, com EcoRI e HindIII. Este fragmento de ADN digerido (80 pb) foi purificado por extração com fenol e precipitação com etanol. A extremidade 5' do gene da  $\beta$ -globina foi isolada a partir do plasmídeo YEp51T/NAT (7.4, supra). O plasmídeo YEp51T/NAT foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 360 pb. Ligou-se este fragmento de 360 pb, purificado, conjuntamente com o fragmento obtido por PCR, ao vector YEp51NT1/ $\gamma$ -Port cortado com SalI e HindIII. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento de ADN foram realizados como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com a enzima de restrição PstI. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que a maior parte dos clones analisados possuíam os fragmentos esperados (dois fragmentos quando digeridos com PstI; três fragmentos a partir do vector sem o inserido). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ $\beta$ -Mot.

#### 15.5.5. CLONAGEM DO GENE DA $\alpha$ -GLOBINA TITUSVILLE (Asp 95 $\rightarrow$ Asn)

A  $\alpha$ -globina Titusville foi criada substituindo uma base no gene de  $\alpha$ -globina natural usando PCR. O gene da  $\alpha$ -globina foi isolado na forma de dois fragmentos. A extremidade 3' do gene (HindIII-HindIII) foi obtida por PCR usando o plasmídeo p19A1GT como molde. Na Figura 45 mostram-se o iniciador 5' e o iniciador 3' usados para a PCR.

Digeriu-se o fragmento mutado do gene da  $\alpha$ -globina com HindIII. Este fragmento de ADN digerido foi purificado por extração

com fenol e precipitação com etanol. A extremidade 5' do gene da  $\alpha$ -globina foi isolada a partir do plasmídeo p19A1GT (10.2.2, supra). O plasmídeo p19A1GT foi digerido com as enzimas de restrição SalI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 300 pb. Ligou-se este fragmento de 300 pb, purificado, conjuntamente com o fragmento obtido por PCR, ao vector YEp51NT1 cortado com SalI e HindIII. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento de ADN foram realizados como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com a enzima de restrição HindII. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que um clone possuía os fragmentos esperados (cinco fragmentos quando digeridos com HindII). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ $\alpha$ Tit.

#### 15.5.6. CLONAGEM DO GENE DA $\alpha$ -GLOBINA 104-Ser (Cys 104 $\rightarrow$ Ser)

A  $\alpha$ -globina 104-Ser foi criada substituindo uma base no gene da  $\alpha$ -globina natural usando PCR. O gene da  $\alpha$ -globina foi isolado na forma de dois fragmentos. A extremidade 3' do gene (HindIII-HindIII) foi obtida por PCR usando o plasmídeo p19A1GT (supra, 10.2.2) como molde. Na Figura 46 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese da sequência.

Digeriu-se o fragmento mutado do gene da  $\alpha$ -globina com HindIII. Este fragmento de ADN digerido foi purificado com extracção com fenol e precipitação com etanol. A extremidade 5' do gene da  $\alpha$ -globina foi isolada a partir do plasmídeo p19A1GT (10.2.2, supra). O plasmídeo p19A1GT foi digerido com as enzimas de restrição SalI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 300 pb. Ligou-se este fragmento de 300 pb, purificado, conjuntamente com o fragmento obtido por PCR, ao vector YEp51NT1 cortado com SalI e HindIII. A ligação do ADN, a transformação de E.coli e o isolamento de ADN foram realizadas como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas com a enzima de restrição HindII. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que um clone possuía os fragmentos esperados (cinco fragmentos quando digeridos com HindII). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ $\alpha$ 104S.

#### 15.5.7. CLONAGEM DO GENE DA $\gamma$ -GLOBINA PORTO ALEGRE (9 Ala $\rightarrow$ Cys)

A  $\gamma$ -globina Porto Alegre foi criada substituindo duas bases na sequência da  $\gamma$ -globina natural usando PCR. O gene da  $\gamma$ -globina foi obtido na forma de um fragmento de 450 pb. Na Figura 47 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese da sequência.

Digeriu-se o gene da  $\gamma$ -globina mutado, obtido por PCR, com SalI e HindIII. Este fragmento de ADN digerido (450 pb) foi purificado por extração com fenol e precipitação com etanol. Ligou-se este fragmento de 450 pb purificado, obtido por PCR, ao vector YEp51NT1 cortado com SalI e HindIII. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento de ADN foram realizados como se descreveu (15.1 supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com a enzima de restrição PstI. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram clones que possuíam os fragmentos esperados (três fragmentos quando digeridos com PstI; dois fragmentos a partir do vector sem inserido). Este plasmídeo foi designado por YEp51NT1/ $\gamma$ -Port.

#### 15.5.8. CLONAGEM DO GENE DA $\gamma$ -GLOBINA CHICO (66Lys $\rightarrow$ Thr)

A  $\gamma$ -globina Chico foi criada substituindo uma base no gene da  $\gamma$ -globina natural usando PCR. O gene da  $\gamma$ -globina foi isolado na forma de dois fragmentos. A extremidade 5' do gene (SalI-XcmI) foi obtida por PCR usando o plasmídeo como molde. Na Figura 48 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese de sequência.

Digeriu-se o fragmento mutado do gene da  $\gamma$ -globina com SalI e XcmI. Este fragmento de ADN digerido (230 pb) foi purificado por extração com fenol e precipitação com etanol. A extremidade 3' do gene da  $\gamma$ -globina foi isolada a partir do plasmídeo YEp51NT1/ $\gamma$ -Port. O plasmídeo YEp51NT1/ $\gamma$ -Port foi digerido com as enzimas de restrição XcmI e HindIII. Isolou-se um fragmento de 220 pb. Ligou-se este fragmento de 220 pb, purificado, conjuntamente com o fragmento obtido por PCR, ao vector YEp51NT1 cortado com SalI e HindIII. A ligação de ADN, a transformação com E.coli e o isolamento com ADN foram realizados como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transforma-

das, com a enzima de restrição PstI. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que um clone possuía os fragmentos esperados (três fragmentos quando digerido com PstI; dois fragmentos a partir do vector sem inserido). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ -Chi.

#### 15.5.9. CLONAGEM DO GENE DA $\alpha$ -GLOBINA TITUSVILLE (Asp 94 $\rightarrow$ Asn)

A  $\alpha$ -globina 94 Asn foi criada substituindo uma base no gene da  $\alpha$ -globina natural, usando PCR. O gene da  $\alpha$ -globina foi isolado na forma de dois fragmentos. Ambos os fragmentos foram obtidos por PCR. A extremidade 5' do gene (SalI-BstEII) foi obtida por PCR usando o plasmídeo 4p7-7 como molde. Na Figura 49 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para síntese da sequência.

A extremidade 3' do gene (BstEII-HindIII) foi obtida por PCR usando o plasmídeo 4p7-7 como molde. Na figura 50 mostram-se os iniciadores 5' e 3' usados para a síntese da sequência.

Digeriu-se um fragmento mutado do gene da  $\alpha$ -globina, obtida por PCR, com SalI e BstEII. Este fragmento de ADN digerido (330 pb) foi purificado por extração com fenol e purificação com etanol. A extremidade 3' do gene da  $\alpha$ -globina, obtida por PCR, foi digerida com as enzimas de restrição BstEII e HindIII. Isolou-se um fragmento de 100 pb. Ligaram-se os fragmentos purificados (330 e 100 pb) ao vector YEp51NT1 cortado com SalI e HindIII. A ligação de ADN, a transformação de *E.coli* e o isolamento de ADN foram realizados como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com a enzima de restrição HindII. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que um clone possuía os fragmentos esperados (cinco fragmentos quando digeridos com HindII). Este fragmento foi designado por pNT1/Z95An.

#### 15.5.10. CLONAGEM DO GENE DA $\beta$ -GLOBINA MISSISSIPPI (Ser 44 $\rightarrow$ Cys)

A  $\beta$ -globina Mississippi foi criada substituindo duas bases no gene da  $\beta$ -globina natural usando PCR. O gene da  $\beta$ -globina foi isolado na forma de dois fragmentos. A extremidade 3' do gene (AccI-HindIII) foi obtida por PCR. Na Figura 51 mostram-se os

iniciadores usados para PCR.

Digeriu-se o fragmento mutado do gene da  $\beta$ -globina com AccI e HindIII. Este fragmento de ADN digerido foi purificado por extracção com fenol e precipitação com etanol. A extremidade 5' do gene da  $\beta$ -globina foi isolado a partir do plasmídeo YEp51T/NAT (7.4, supra). O plasmídeo YEp51T/NAT foi digerido com as enzimas de restrição AccI e SalI. Isolou-se um fragmento de 117 pb. Ligou-se este fragmento purificado, de 117 pb, conjuntamente com o fragmento obtido por PCR, ao vector YEp51NT1/ $\beta$ -Port. A ligação de ADN, a transformação de E.coli e o isolamento de ADN foram realizados como se descreveu (15.1, supra). Digeriu-se o ADN, isolado a partir das células transformadas, com a enzima de restrição PstI. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram que a maior parte dos clones analisados possuía os fragmentos esperados (dois fragmentos quando digeridos com PstI; três fragmentos a partir do vector sem inserido). Este plasmídeo foi designado por pNT1/ $\beta$ -Miss.

#### 15.6. EXPRESSÃO DE GLOBINAS VARIANTES

##### 15.6.1. EXPRESSÃO DE BETA-GLOBINA TaLi EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -TaLiS usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose, e suplementado com 20 mg/l de, cada um, de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C, num balão agitado, até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween 80 e suplementado com 20 mg/l de, cada um, de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução ajustou-se o pH a 7,03 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre duas e 50 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de

mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. A globina detectada era 0,4% da proteína solúvel.

#### 15.6.2. EXPRESSÃO DA ALFA-GLOBINA TITUSVILLE EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo pNT1/ $\alpha$ Tit usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano a 30°C, num balão agitado, até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80 e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 6,93 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre duas e oito horas após a indução.

As proteínas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. Detectaram-se globinas nas amostras colhidas, quatro a seis horas após a indução (0,01-0,04% da proteína).

#### 15.6.3. EXPRESSÃO DA ALFA-GLOBINA SERINA 104 EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo pNT1/ $\alpha$ 104S usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C, num balão agitado, até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween 80 e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 6,82

com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre uma e 30 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. Recolheram-se amostras entre uma e 30 horas após a indução. A globina detectada era 0,1% da proteína solúvel.

#### 15.6.4. EXPRESSÃO DA GAMA-GLOBINA PORTO ALEGRE EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc1114 com o plasmideo YEp51NT1/Port usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C, num balão agitado até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80 e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 7,03 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre duas e 27 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. Todas as amostras continham níveis detectáveis de globina (0,1-1,3%).

#### 15.6.5. EXPRESSÃO DA GAMA-GLOBINA CHICO EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmideo pNT1/ $\gamma$ -Chi usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C num balão agitado até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de



partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 7,06 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40 µg/ml. Recolheram-se amostras entre duas e oito horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. Detectou-se globina.

O espectro de diferença de monóxido de carbono de visível, das células de levedura inteiras, é gerado usando um procedimento adaptado dos métodos de Springer e Slager (1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8961). Prepararam-se aproximadamente 1,2 ml de suspensão de levedura com uma D.O. final a 600 nm de cerca de 2,0, usando  $\text{PO}_4$  0,1 mM, pH 7,0, como tampão. Depois, reduz-se a suspensão com um pequeno volume de ditionito de sódio, agita-se num agitador de vórtice, e deixa-se em repouso durante um minuto. Depois, retira-se 1 ml e coloca-se numa "cuvette" de pequeno volume, a todo o comprimento. Usa-se esta suspensão como linha de base para um varrimento num espectrofotómetro registador Beckman DU-70, de feixe simples, entre 400 e 500 nm. Depois, remove-se a "cuvette" e faz-se borbulhar, na suspensão, monóxido de carbono (CO), isento de oxigénio, de um modo constante mas não vigoroso. Mistura-se a suspensão agitando gentilmente durante um minuto e traça-se o espectro entre 400 e 500 nm. Por fim, mede-se o valor da D.O. a 600 nm no mesmo instrumento.

Se está presente hemoglobina, o espectro de diferença produzirá um pico a cerca de 420 nm e um vale a cerca de 435 nm. Um único pico a 420 nm não indica a presença de hemoglobina.

Nesta estirpe detectou-se, por este método, hemoglobina funcional.

#### 15.6.6. EXPRESSÃO DA BETA-GLOBINA MISSISSIPPI EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -Miss usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C, num balão agitado, até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 7,06 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre duas e 50 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. A globina detectada era 0,4% da proteína solúvel.

#### 15.6.7. EXPRESSÃO DA BETA-GLOBINA RAINIER EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc1090 com o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -Ran usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C, num balão agitado, até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução ajustou-se o pH a 7,06 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre duas e 50 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. A globina detectada era 0,4% da proteína solúvel.

#### 15.6.8. EXPRESSÃO DA BETA GLOBINA MOTOWN EM LEVEDURA

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -Mot usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C, num balão agitado, até à fase logarítmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 7,06 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Recolheram-se amostras entre duas e 8 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. A globina detectada era 0,1% da proteína solúvel.

#### 16. EXEMPLO 11: CO-EXPRESSÃO DE UM MUTANTE DE DELECCÃO DE ALFA-GLOBINA E DA GAMA-GLOBINA EM LEVEDURA, POR CO-TRANSFORMAÇÃO

##### 16.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Usou-se a estirpe de levedura Sc340. Cultivaram-se as células de levedura em 500 ml de caldo YEPD com agitação vigorosa, a 30°C, até um valor de D.O. de 1,3-1,5. Recolheram-se as células de uma cultura de 500 ml, por centrifugação, a 5000 rpm durante 5 minutos, a 4°C. As células e o rotor estiveram sempre mantidos a frio. Lavaram-se as células 2X com água destilada, esterilizada, fria, e recolheram-se por centrifugação a 4°C. Ressuspenderam-se as células em 20 ml de sorbitol 1 M arrefecido em gelo e mistura-

ram-se por pipetagem. Recolheram-se as células e ressuspenderam-se num volume final de 0,5-1 ml de sorbitol (1 M) arrefecido em gelo.

Para a electroporação usou-se um equipamento Biorad (Richmond, CA) Gene Pulser com um controlador de impulsos. As "cuvettes" de 0,2 cm foram obtidas na Biorad. Transferiram-se 40 µl de células de levedura para um tubo Eppendorf esterilizado. Às células adicionou-se ADN (1-100 ng) em 5 µl de TE. Incubou-se a mistura em gelo durante 5 minutos, transferiu-se para uma "cuvette" de 0,2 cm e submeteu-se a um impulso a 1,5 kV, 25 µF, 200 ohm, durante 5 msegundos. À "cuvette" adicionaram-se, imediatamente, 250 µl de sorbitol 1 M frio, misturou-se gentilmente o conteúdo e colocaram-se as células sobre as placas apropriadas.

#### 16.2. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc340 COM pNM-R-G-α1 E YEp51T/G

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com os plasmídeos pNM-R-G-α1 (11.3, supra) e YEp51T/G (8.4, supra) usando electroporação.

#### 16.3. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6 (0,4% da proteína solúvel).

#### 16.4. DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA EM LEVEDURA POR ESPECTRO DE DIFERENÇA DE MONÓXIDO DE CARBONO

O espectro de diferença de monóxido de carbono de visível, das células de levedura inteiras, é gerado usando um procedimento adaptado dos métodos de Springer e Slager (1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8961). Preparam-se aproximadamente 1,2 ml de suspensão de levedura, com uma D.O. final a 600 nm de cerca de 2,0, usando PO<sub>4</sub> 0,1 mM pH 7,0, como tampão. Depois, reduz-se a suspensão com um pequeno volume de ditionito de sódio, agita-se num agitador de vórtice e deixa-se em repouso durante um minuto. Depois, retira-se 1 ml e coloca-se numa "cuvette" de pequeno volume, a todo o comprimento. Usa-se esta suspensão como linha de

base para um varrimento num espectrofotómetro registador Beckman DU-70 de feixe simples, entre 400 e 500 nm. Depois, remove-se a "cuvette" e faz-se borbulhar, na suspensão, monóxido de carbono (CO), isento de oxigénio, de um modo constante mas não vigoroso durante 2 minutos. Mistura-se a suspensão, agitando gentilmente durante um minuto e traça-se o espectro entre 400 e 500 nm. Por fim, mede-se o valor de D.O. a 600 nm no mesmo instrumento.

Se está presente hemoglobina, o espectro de diferença produzirá um pico a cerca de 420 nm e um vale a cerca de 435 nm. Um único pico a 420 nm não indica a presença de hemoglobina.

Neste estirpe detectou-se, por este método, hemoglobina funcional (heme 10  $\mu$ M).

## 17. EXEMPLO 12: CO-EXPRESSÃO DE MUTANTE DE DELECÇÃO DE ALFA-GLOBINA E DA GAMA<sub>val</sub>-GLOBINA EM LEVEDURA POR CO-TRANSFORMAÇÃO

### 17.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Usou-se a estirpe de levedura Sc1113. Cultivaram-se as células de levedura em 500 ml de caldo YEPD com agitação vigorosa a 30°C até uma D.O. de 1,3-1,5. Recolheram-se as células de uma cultura de 500 ml, por centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. As células e o rotor estiveram sempre mantidos a frio. Lavaram-se as células 2X com água destilada, esterilizada, fria, e recolheram-se por centrifugação a 4°C. Ressuspenderam-se as células em 20 ml de sorbitol 1M arrefecido em gelo e misturaram-se por pipetagem. Recolheram-se as células e ressuspenderam-se num volume final de 0,5-1 ml de sorbitol (1M) arrefecido em gelo.

Para a electroporação usou-se um equipamento Biorad (Richmond, CA) Gene Pulser com um controlador de impulsos. As "cuvettes" de 0,2 cm foram obtidas na Biorad. Transferiram-se 40  $\mu$ l de células de levedura para um tubo Eppendorf esterilizado. As células adicionou-se ADN (1-100 ng) em 5  $\mu$ l de TE. Incubou-se a mistura em gelo durante 5 minutos, transferiu-se para uma "cuvette" de 0,2 cm e submeteu-se a um impulso a 1,5 kV, 25  $\mu$ F, 200 ohm, durante 5 msegundo. À "cuvette" adicionaram-se imediatamente 250  $\mu$ l de sorbitol 1M frio, misturou-se gentilmente o conteúdo e colocaram-se as células sobre as placas apropriadas.

#### 17.2. TRANSFORMAÇÃO DAS ESTIRPES DE LEVEDURA Sc1113 E Sc340 COM pNM-R-G- $\alpha$ 1 E pNM-5-G- val<sup>1</sup>

Transformou-se a estirpe de levedura Sc1113 com os plasmídeos pNM-R-G- $\alpha$ 1 (11.3, supra) e pNM-5-G- val<sup>1</sup> (9.4, supra), usando electroporação.

#### 17.3. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6 (0,1% da proteína solúvel)

#### 17.4. ESPECTRO Soret DA HEMOGLOBINA EM LEVEDURA

O espectro Soret indicou absorvância na região de 418 nm que é característica da hemoglobina e que não está presente em levedura de controlo que não exprime globinas.

### 18. EXEMPLO 13: CO-EXPRESSÃO DE UM MUTANTE DE DELEÇÃO DE ALFA-GLOBINA E DA BETA-GLOBINA PORTO ALEGRE EM LEVEDURA POR CO-TRANSFORMAÇÃO

#### 18.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Usou-se a estirpe de levedura Sc1040. Cultivaram-se as células de levedura em 500 ml de caldo YEPD com agitação vigorosa a 30°C até uma D.O. de 1,3-1,5. Recolheram-se as células de uma cultura de 500 ml por centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. As células e o rotor estiveram sempre mantidos frios. Lavaram-se as células 2X com água destilada esterilizada fria e recolheram-se por centrifugação a 4°C. Ressuspenderam-se as células em 20 ml de sorbitol 1M arrefecido em gelo e misturaram-se por pipetagem. Recolheram-se as células e ressuspenderam-se num volume final de 0,5-1 ml de sorbitol (1M) arrefecido em gelo.

Para a electroporação usou-se um equipamento Biorad (Richmond, CA) Gene Pulser, com um controlador de impulsos. As "cuvettes" de 0,2 cm foram obtidas na Biorad. Transferiram-se 40  $\mu$ l de células de levedura para um tubo Eppendorf esterilizado. As células adicionou-se ADN (1-100 ng) em 5  $\mu$ l de TE. Incubou-se a mistura em gelo durante 5 minutos, transferiu-se para uma "cuvette"

de 0,2 cm e submeteu-se a um impulso de 1,5 kV, 25  $\mu$ F, 200 ohm, durante 5 msegundo. À "cuvette" adicionaram-se imediatamente 250  $\mu$ l de sorbitol 1M frio, e misturou-se gentilmente o conteúdo e colocaram-se as células sobre as placas apropriadas.

#### 18.2. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1041 COM pNM-R-G- $\alpha$ 1 E YE<sub>p</sub>WB51T/Port

Transformou-se a estirpe de levedura Sc1041 com os plasmídeos pNM-R-G- $\alpha$ 1 (11.3, *supra*) e YE<sub>p</sub>WB51T/Port (6.2, *supra*) usando electroporação.

#### 18.3. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6. Os níveis de globina detectados eram de 0,03% da proteína solúvel.

#### 18.4. ESPECTRO Soret DA HEMOGLOBINA EM LEVEDURA

O espectro Soret indicou absorvância na região de 418 nm que é característica da hemoglobina e que não está presente em levedura de controlo que não exprime globinas.

### 19. EXEMPLO 14: CO-EXPRESSÃO DE UM MUTANTE DE DELEÇÃO D E ALFA-GLOBINA E DA BETA-GLOBINA CHICO EM LEVEDURA POR CO-TRANSFORMAÇÃO

#### 19.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Usou-se a estirpe de levedura Sc1090. Cultivaram-se as células de levedura em 500 ml de caldo YEPD com agitação vigorosa a 30°C até uma D.O. de 1,3-1,5. Recolheram-se as células de uma cultura de 500 ml por centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. As células e o rotor estiveram sempre mantidos frias. Lavaram-se as células com 2X água destilada esterilizada fria e recolheram-se por centrifugação a 4°C. Ressuspenderam-se em 20 ml de sorbitol 1M arrefecido em gelo e misturaram-se por pipetagem. Recolheram-se as células e ressuspenderam-se num volume final de 0,5-1 ml de sorbitol (1M) arrefecido em gelo.

Para a electroporação usou-se um equipamento Biorad (Richmond, CA) Gene Pulser, com um controlador de impulsos. As "cuvettes" de 0,2 cm foram obtidas na Biorad. Transferiram-se 40  $\mu$ l de células de levedura para um tubo Eppendorf esterilizado. Às células adicionou-se ADN (1-100 ng) em 5  $\mu$ l de TE. Incubou-se a mistura em gelo durante 5 minutos, transferiu-se para uma "cuvette" de 0,2 cm e submeteu-se a um impulso a 1,5 kV, 25  $\mu$ F, 200 ohm durante 5 msegundos. À célula adicionam-se imediatamente, 250  $\mu$ l de sorbitol 1M frio, misturou-se gentilmente o conteúdo e colocaram-se as células sobre as placas apropriadas.

#### 19.2. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1090 COM pNM-R-G- $\alpha$ E pNT1/ $\beta$ -Chico

Transformou-se a estirpe de levedura Sc1090 com os plasmídeos pNM-R-G- $\alpha$ 1 (11.3, supra) e pNT1/ $\beta$ -Chico (15.5.1, supra) usando electroporação.

#### 19.3. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6. Detectaram-se níveis de globina de 0,4% de proteína solúvel.

#### 19.4. DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA EM LEVEDURA POR ESPECTRO DE DIFERENÇA DE MONÓXIDO DE CARBONO

O espectro de diferença de monóxido de carbono de visível, das células de levedura inteiras, é gerado usando um procedimento adaptado dos métodos de Springer e Slager (1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8961). Prepararam-se aproximadamente 1,2 ml de suspensão de levedura com uma D.O. final a 600 nm de cerca de 2,0, usando  $\text{PO}_4$  0,1 mM, pH 7,0, como tampão. Depois, reduz-se a suspensão com um pequeno volume de ditionito de sódio, agita-se num agitador de vórtice e deixa-se em repouso durante um minuto. Depois, retira-se 1 ml e coloca-se numa "cuvette" de pequeno volume, a todo o comprimento. Usa-se esta suspensão como linha de base para um varrimento num espectrofotómetro registador Beckman DU-70, de feixe simples, entre 400 e 500 nm. Depois remove-se a "cuvette" e faz-se borbulhar, na suspensão, monóxido de carbono

(CO), isento de oxigénio, de um modo constante mas não vigoroso durante 2 minutos. Mistura-se a suspensão agitando gentilmente durante um minuto e traça-se o espectro entre 400 e 500 nm. Por fim, mede-se o valor de D.O. a 600 nm no mesmo instrumento.

Se está presente hemoglobina, o espectro de diferença produzirá um pico a cerca de 420 nm e um vale a cerca de 435 nm. Um único pico a 420 nm não indica a presença de hemoglobina.

Nesta estirpe detectou-se, por este método, hemoglobina funcional.

## 20. EXEMPLO 15: CO-EXPRESSÃO DE MUTANTE DE DELECCÃO DE ALFA-GLOBINA E DA GAMA-GLOBINA PORTO ALEGRE EM LEVEDURA POR CO-TRANSFORMAÇÃO

### 20.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Usou-se a estirpe de levedura Sc340. Cultivaram-se as células de levedura em 500 ml de caldo YEPD com agitação vigorosa a 30°C, até uma D.O. de 1,3-1,5. Recolheram-se as células de uma cultura de 500 ml por centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. As células e o rotor estiveram sempre mantidos frias. Lavaram-se as células com 2X água destilada, esterilizada fria e recolheram-se por centrifugação a 4°C. Ressuspenderam-se as células em 20 ml de sorbitol 1M arrefecido em gelo e misturaram-se por pipetagem. Recolheram-se as células e ressuspenderam-se num volume final de 0,5-1 ml de sorbitol (1M) arrefecido em gelo.

Para a electroporação usou-se um equipamento Biorad (Richmond, CA) Gene Pulser com um controlador de impulsos. As "cuvettes" de 0,2 cm foram obtidas na Biorad. Transferiram-se 40 µl de células de levedura para um tubo Eppendorf esterilizado. As células adicionou-se ADN (1-100 ng) em 5 µl de TE. Incubou-se a mistura em gelo durante 5 minutos, transferiu-se para uma "cuvette" de 0,2 cm e submeteu-se a um impulso a 1,5 kV, 25 µF, 200 ohm durante 5 msegundos. À "cuvette" adicionaram-se imediatamente 250 µl de sorbitol 1M frio, misturou-se gentilmente o conteúdo e colocaram-se as células sobre as placas apropriadas.

### 20.2. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc340 COM pNM-R-G- $\alpha$ 1 E

YEpNT1/ -Port

Transformou-se a estirpe de levedura Sc340 com os plasmídeos pNM-R-G- $\alpha$ 1 (11.3, supra) e YEpNT1/ -Port (15.5.9, supra) usando electroporação.

20.3. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos descritos na Secção 6.6.

20.4. DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA EM LEVEDURA POR ESPECTRO DE DIFERENÇA DE MONÓXIDO DE CARBONO

O espectro de diferença de monóxido de carbono de visível, das células de levedura inteiras, é gerado usando um procedimento adaptado dos métodos de Springer e Slager (1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8961). Prepararam-se aproximadamente 1,2 ml de suspensão de levedura com uma D.O. final a 600 nm de cerca de 2,0, usando  $\text{PO}_4$  0,1 mM, pH 7,0, como tampão. Depois, reduz-se a suspensão com um pequeno volume de ditionito de sódio, agita-se num agitador de vórtice e deixa-se em repouso durante um minuto. Depois, retira-se 1 ml e coloca-se numa "cuvette" de pequeno volume, a todo o comprimento. Usa-se esta suspensão como linha de base para um varrimento num espectrofotómetro registador Beckman DU-70, de feixe simples, entre 400 e 500 nm. Depois, remove-se a "cuvette" e faz-se borbulhar, na suspensão, monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ), isento de oxigénio, de um modo constante mas não vigoroso durante 2 minutos. Mistura-se a suspensão agitando gentilmente durante um minuto e traça-se o espectro entre 400 e 500 nm. Por fim mede-se o valor de D.O. a 600 nm no mesmo instrumento.

Se está presente hemoglobina, o espectro de diferença produzirá um pico a cerca de 420 nm e um vale a cerca de 435 nm. Um único pico a 420 nm não indica a presença de hemoglobina.

Nesta estirpe detectou-se, por este método, hemoglobina funcional.

21. EXEMPLO 16: CO-EXPRESSÃO DA ZETA-GLOBINA TITUSVILLE E DA GA-

## MA-GLOBINA EM LEVEDURA POR CO-TRANSFORMAÇÃO

### 21.1. TRANSFORMAÇÃO DA ESTIRPE DE LEVEDURA Sc1115 COM pNT1/Z95An E YEp51T/G

Transformou-se a estirpe de levedura Sc1115 com os plasmídeos YEp51T/G (8.4, *supra*) e pNT1/Z95An (15.5.12, *supra*) usando electroporação. Para a cultura de partida, desenvolveram-se as células em meio mínimo contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 1% de rafinose e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano, a 30°C num balão agitado até à fase logaritmica. Usou-se a cultura de partida para inocular 500 ml de meio contendo 0,67% de base de azoto de levedura, 3% de glicerol, 2% de ácido láctico, 1% de rafinose, 0,4% de Tween-80, e suplementado com 20 mg/l de cada um de adenina, histidina, uracilo e triptofano. A incubação foi realizada a 30°C com agitação. A cultura foi induzida pela adição de galactose até uma concentração final de 2%. Na indução, ajustou-se o pH a 7,06 com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e adicionou-se hemina até uma concentração final de 40 µg/ml. Recolheram-se amostras entre duas e 30 horas após a indução.

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6.

### 21.2. ANÁLISE DE MANCHA WESTERN DA GLOBINA EXPRESSA

As globinas expressas foram quantificadas por análise de Mancha Western usando os procedimentos que se descrevem na Secção 6.6. A globina detectada era 0,2% da proteína solúvel.

### 21.3. DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA EM LEVEDURA POR ESPECTRO DE DIFERENÇA DE MONÓXIDO DE CARBONO

O espectro de diferença de monóxido de carbono de visível, das células de levedura inteiras, é gerado usando um procedimento adaptado dos métodos de Springer e Slager (1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8961). Preparam-se aproximadamente 1,2 ml de suspensão de levedura com uma D.O. final a 600 nm de cerca de 2,0, usando  $\text{PO}_4$  0,1 mM, pH 7,0, como tampão. Depois, reduz-se a suspensão com um pequeno volume de ditionito de sódio, agita-se

num agitador de vórtice e deixa-se em repouso durante um minuto. Depois, retira-se 1 ml e coloca-se numa "cuvette" de pequeno volume, a todo o comprimento. Usa-se esta suspensão como linha de base para um varrimento num espectrofotômetro registador Beckman DU-70, de feixe simples, entre 400 e 500 nm. Depois, remove-se a "cuvette" e faz-se borbulhar, na suspensão, monóxido de carbono (CO), isento de oxigénio, de um modo constante mas não vigoroso durante 2 minutos. Mistura-se a suspensão agitando gentilmente durante um minuto e traça-se o espectro entre 400 e 500 nm. Por fim mede-se o valor de D.O. a 600 nm no mesmo aparelho.

Se está presente hemoglobina o espectro de diferença produzirá um pico a cerca de 420 nm e um vale a cerca de 435 nm. Um único pico a 420 nm não indica a presença de hemoglobina.

Nesta estirpe detectou-se, por este método, hemoglobina funcional.

### 23. DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

As estirpes de levedura seguintes das espécies Saccharomyces cerevisiae, contendo os plasmídeos listados, foram depositadas no Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL.

#### Acesso

| <u>Estirpe de levedura</u> | <u>Plasmídeo</u>         | <u>Numero</u> | <u>Data do Depósito</u> |
|----------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|
| 340g2p                     | YEpWB51WB/Port           | Y-18640       | 2 de Abril de 1990      |
| 340VGTB                    | pNML-V-G-1               | Y-18641       | 2 de Abril de 1990      |
| 340g2G                     | YEp51T/G                 | Y-18695       | 7 de Agosto de 1990     |
| 3405GgVAL                  | pNM-5-G- $\gamma_{val1}$ | Y-18735       | 16 de Outubro de 1990   |
| Sc1012-R-A-a1              | pNM-R-A-a1               | Y-18694       | 7 de Agosto de 1990     |
| 1041GagCot1                | pNM-R-G-a1               | Y-18794       | 27 de Março de 1991     |
|                            | pNML-V-G-1               |               |                         |
| 1115X1VGab                 | pBM-V-X1-G-aB            | Y-18791       | 27 de Março de 1991     |
| 340GagCot6                 | pNM-R-G-a1               | Y-18792       | 27 de Março de 1991     |
|                            | YEp51T/G                 |               |                         |
| 1113GagVALCot5             | pNM-R-G-a1               | Y-18793       | 27 de Março de 1991     |
|                            | pNM-5-G- $\gamma_{val1}$ |               |                         |
| 340g2GC                    | pNT1/ $\gamma$ -Chico    | Y-18801       | 27 de Março de 1991     |

|                 |                             |         |                     |
|-----------------|-----------------------------|---------|---------------------|
| 1114g2GP        | YEp51NT1/ $\gamma$ -PORT RT | Y-18798 | 27 de Março de 1991 |
| 340g2ATi        | pNT1/ $\alpha$ Tit          | Y-18795 | 27 de Março de 1991 |
| 340g2A104S      | pNT1/ $\alpha$ 104S         | Y-18797 | 27 de Março de 1991 |
| 340g2BMo        | pNT1/ $\beta$ -Mot          | Y-18799 | 27 de Março de 1991 |
| 340g2BTaS       | pNT1/ $\beta$ -TaLiS        | Y-18804 | 29 de Março de 1991 |
| 340g2GPRA       | pNM-R-G- $\alpha$ 1         | Y-18800 | 29 de Março de 1991 |
|                 | YEp51NT1/ $\gamma$ -PORT    |         |                     |
| 1090g2BChRA1    | pNM-R-G- $\alpha$ 1         |         | 29 de Março de 1991 |
|                 | pNT1/ $\gamma$ -Chico       |         |                     |
| 1090g2BRa       | pNT1/ $\beta$ -Ran          | Y-18802 | 29 de Março de 1991 |
| 340g2BMS        | pNT1/ $\beta$ -Miss         | Y-18803 | 29 de Março de 1991 |
| 1113X8agVAL1    | pBM-V-X8-Ga $\gamma_{val}$  | Y-18806 | 6 de Abril de 1991  |
| 1041gaTPORTCot7 | pNM-R-G- $\alpha$ 1         | Y-18807 | 6 de Abril de 1991  |
|                 | YEpWB51T/Port               |         |                     |
| 1115g2GTZTi     | pNT1/Z95                    | y-18808 | 6 de Abril de 1991  |
|                 | YEp51T/G                    |         |                     |

A invenção que aqui se descreve e reivindica não está limitada no seu âmbito pelas concretizações específicas que aqui se descrevem, uma vez que se pretende que estas concretizações sejam ilustrações dos vários aspectos da invenção. Pressupõe-se que quaisquer concretizações equivalentes sejam também abrangidas pelo âmbito da invenção. De facto, várias modificações da invenção, para além das que aqui se mostram e descrevem, serão evidentes para os peritos na arte a partir da descrição anterior. Entende-se também que estas modificações estão incluídas no âmbito das reivindicações.

São aqui citadas várias referências, cujas descrições são aqui incorporadas como referência na sua totalidade.

### REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para a produção de uma cadeia de globina ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de globina ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iii) uma segunda sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) uma origem de replicação de levedura; e (v) uma sequência de terminação da transcrição; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina ou o seu fragmento de ligação a heme.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o promotor transcricional de levedura ser um promotor transcricional indutível.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o promotor transcricional indutível de levedura ser um promotor transcricional unidireccional.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o promotor transcricional indutível de levedura ser um promotor transcricional bidireccional.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o promotor transcricional de levedura ser um promotor transcricional constitutivo.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o promotor transcricional de levedura, compreender: (i) uma primeira sequência contendo uma região reguladora transcricional de um promotor indutível; e (ii) uma segunda sequência contendo

uma região de iniciação da transcrição de um promotor constitutivo localizado a jusante da primeira sequência.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a primeira sequência do promotor transcricional de levedura ser uma sequência de activação a montante, de um promotor indutível de levedura.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ser o gene LEU2.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ser o gene leu2d.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ser o gene URA3.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a origem de replicação de levedura ser um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a origem de replicação ser uma sequência de replicação autónoma.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de ADN codificar uma cadeia de globina tipo alfa ou uma sua variante substancialmente homóloga.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a cadeia de globina do tipo alfa ser uma cadeia de zeta-globina embrionária ou uma sua variante substancialmente homóloga.

15 - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a cadeia de globina do tipo alfa ser uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto ou uma sua variante substancialmente homóloga.

16 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de ADN codificar uma cadeia de globina tipo beta ou uma sua variante substancialmente homóloga.

17 - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a globina do tipo beta ser uma cadeia de beta-globina de ser humano adulto ou uma sua variante substancialmente homóloga.

18 - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a cadeia de globina do tipo beta ser uma cadeia de gama-globina de feto humano.

19 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o vector de ADN recombinante compreender uma primeira sequência de ADN codificando uma primeira cadeia de globina e uma segunda sequência de ADN codificando uma segunda cadeia de globina.

20 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o vector de ADN recombinante compreender ainda uma segundo promotor transcricional de levedura que promove a transcrição da segunda sequência de ADN.

21 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de globina variante ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iii) uma segunda sequência de ADN codificando um marcador

seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo a que seja expressa a cadeia de globina variante ou o seu fragmento de ligação a heme.

22 - Processo para a produção de uma cadeia de gama-globina ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante compreendendo: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de gama-globina ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de gama-globina ou o seu fragmento de ligação a heme; (iii) uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de gama-globina ou o seu fragmento de ligação a heme.

23 - Processo para a produção de uma cadeia de zeta-globina ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de zeta-globina ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de zeta-globina ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iii) uma segunda sequência de ADN codificando um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de zeta-globina ou o seu fragmento de ligação a heme.

24 - Processo para a produção de uma cadeia de beta-globina Porto Alegre humana ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de beta-globina Porto Alegre humana, numa célula de levedura compreendendo: (i) um promotor GAL10, (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de beta-globina Porto Alegre humana; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de beta-globina Porto Alegre ou o seu fragmento de ligação a heme.

25 - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo YE $\mu$ WB51/Port.

26 - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18640 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

27 - Processo para a produção de uma cadeia de gama-globina de feto humano ou de um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de gama-globina de feto humano, numa célula de levedura compreendendo: (i) um promotor GAL10, (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de gama-globina de feto humano; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de gama-globina fetal, que compreende a

região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de gama-globina de feto humano ou o seu fragmento de ligação a heme.

28 - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo YEp51T/G.

29 - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18695 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

30 - Processo para a produção de uma cadeia de gama-globina de feto humano, variante, que compreende uma valina na posição gama-1 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de gama-globina de feto humano, variante, que compreende uma valina na posição gama-1, compreendendo: (i) um promotor híbrido compreendendo um promotor GAL10 e um promotor IDH3; (ii) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de gama-globina humana, variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal e que compreende uma valina na posição gama-1, sequência esta localizada a jusante do promotor híbrido; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2µ ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de gama-globina de feto humano,

que compreende uma valina na posição gama-1, ou o seu fragmento de ligação a heme.

31 - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmideo pNM-5-G- val-.

32 - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18735 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

33 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto e que compreende uma serina na posição alfa-104 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir numa célula de levedura uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto e que compreende uma serina na posição alfa-104, compreendendo: (i) um promotor GAL10 e um promotor IDH3; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto e que compreende uma serina na posição alfa-104; (iii) um marcador URA3 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2µ ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto e que compreende uma serina na posição alfa-104,

ou o seu fragmento de ligação a heme.

34 - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo pNT1/a104S.

35 - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18797 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

36 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal e que compreende uma cisteína na posição gama-9 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama- -globina fetal e que compreende uma cisteína na posição gama-9, compreendendo: (i) um promotor GAL10; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano e que compreende uma cisteína na posição gama-9; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano e que compreende uma cisteína na posição gama-9, ou o seu fragmento de ligação a heme.

37 - Processo de acordo com a reivindicação 36, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo YEpNT1/ PORT.

38 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18798 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

39 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal e que compreende uma treonina na posição gama-66 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama- -globina de feto humano e que compreende uma treonina na posição gama-66, compreendendo: (i) um promotor GAL10; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor híbrido, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal e que compreende uma treonina na posição gama-66; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2µ ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase 1; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga à cadeia de gama-globina de feto humano, que compreende uma treonina na posição gama-66, ou o seu fragmento de ligação a heme.

40 - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo pNT1/ Chico.

41 - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18801 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

42 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende um ácido glutâmico na posição beta-127 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende um ácido glutâmico na posição beta-127, compreendendo: (i) um promotor GAL10 ; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende um ácido glutâmico na posição beta-127; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante humana, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-de-sidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto, que compreende um ácido glutâmico na posição beta-127, ou o seu fragmento de ligação a heme.

43 - Processo de acordo com a reivindicação 42, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -Mot.

44 - Processo de acordo com a reivindicação 42,

caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18799 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

45 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-83 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-83, compreendendo: (i) um promotor GAL10 ; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-83; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina humana, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina humana, que compreende uma cisteína na posição beta-83, ou o seu fragmento de ligação a heme.

46 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -Talis.

47 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18804

ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

48 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-44 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-44, compreendendo: (i) um promotor GAL10 ; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-44; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante humana, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto, que compreende uma cisteína na posição beta-44, ou o seu fragmento de ligação a heme.

49 - Processo de acordo com a reivindicação 48, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo pNT1/ $\beta$ -Miss.

50 - Processo de acordo com a reivindicação 48, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18803 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

51 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-145 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-145, compreendendo: (i) um promotor GAL10; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina de adulto e que compreende uma cisteína na posição beta-145; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de beta-globina humana, que compreende uma cisteína na posição beta-145, ou o seu fragmento de ligação a heme.

52 - Processo de acordo com a reivindicação 51, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmideo pNT1/ $\beta$ -Ran.

53 - Processo de acordo com a reivindicação 51, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18802 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

54 - Processo para a produção de uma cadeia de globina variante humana, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de

alfa-globina de adulto e que compreende uma asparagina na posição alfa-94 ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender:

(a) a introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina de adulto e que compreende uma asparagina na posição alfa-94, compreendendo: (i) um promotor GAL10; (ii) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina de adulto e que compreende uma asparagina na posição alfa-94; (iii) um marcador LEU2 seleccionável ou uma sua porção funcionalmente activa; (iv) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e (v) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que seja expressa a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de alfa-globina humana, que compreende uma asparagina na posição alfa-94, ou o seu fragmento de ligação a heme.

55 - Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmideo pNT1/ $\alpha$ Tit.

56 - Processo de acordo com a reivindicação 54, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18795 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

57 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente

homóloga, e uma cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa primeira célula de levedura, um vector de ADN recombinante, compreendendo o vector de ADN recombinante: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura;

(b) introduzir, numa segunda célula de levedura, um vector de ADN recombinante, compreendendo: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN codificando a cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura;

(c) cultivar a primeira célula de levedura de modo que seja expressa a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga;

(d) cultivar a segunda célula de levedura de modo que seja

expressa a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga;

(e) isolar, da primeira célula de levedura, a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga ;

(f) isolar, da segunda célula de levedura, a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga ; e

(g) combinar, com uma fonte de heme, a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga, isolados, e a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga, isolados.

58 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga, e uma cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, um vector de ADN recombinante, compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) uma segunda sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante

substancialmente homóloga; (iii) um primeiro promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iv) um segundo promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da segunda sequência de ADN; (v) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (vi) uma origem de replicação de levedura;

(b) cultivar a célula de levedura de modo que seja expressa a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga, e uma cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga;

(c) isolar, da célula de levedura, a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga, e a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga ; e

(d) combinar, com uma fonte de heme, a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga, e uma cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga .

59 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga, e uma cadeia variante de globina tipo beta ou um seu fragmento de ligação a heme, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, um vector de ADN recombinante, compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) uma segunda sequência de ADN codificando uma cadeia variante de globina tipo beta, ou um seu fragmento de ligação a heme; (iii) um primeiro promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iv) um segundo promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da segunda sequência de ADN; (v) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (vi) uma origem de replicação de levedura;

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado, de modo que a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga, e uma cadeia variante de globina tipo beta, ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressos e ligados conjuntamente a heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

60 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia variante de globina tipo alfa, ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de globina tipo beta ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, um vector de ADN recombinante, compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia variante de globina tipo alfa, ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo beta, ou um seu fragmento de ligação a heme; (iii) um primeiro promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iv) um segundo promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da segunda sequência de ADN; (v) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável

de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (vi) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado, de modo que a cadeia variante de globina tipo alfa, ou o seu fragmento de ligação a heme, e a cadeia de globina tipo beta, ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressos e ligados, conjuntamente a heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

61 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de alfa-globina de adulto, ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de gama-globina, ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, um vector de ADN recombinante, compreendendo: (i) uma primeira sequência de ADN codificando uma cadeia de alfa-globina de adulto, ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) uma segunda sequência de ADN codificando uma cadeia de gama-globina, ou um seu fragmento de ligação a heme; (iii) um primeiro promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da primeira sequência de ADN; (iv) um segundo promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da segunda sequência de ADN que codifica a cadeia de gama-globina ou uma sua variante substancialmente homóloga; (v) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (vi) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado, de modo que a cadeia de alfa-globina de adulto, ou um seu fragmento de ligação a heme, e a cadeia de gama-globina, ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressos e ligados, conjuntamente a heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

62 - Processo para a produção de uma hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal e que compreende uma

valina na posição gama-1 e uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de um vector de ADN recombinante que compreende:

(i) um primeiro promotor híbrido compreendendo um promotor ADH2 e um promotor IDH3;

(ii) uma primeira sequência de ADN localizada a jusante do primeiro promotor híbrido, codificando uma cadeia de globina variante, que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal e que compreende uma valina na posição gama-1;

(iii) uma primeira sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da primeira sequência de ADN, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I;

(iv) um segundo promotor híbrido compreendendo um promotor ADH2 e um promotor IDH3;

(v) uma segunda sequência de ADN localizada a jusante do segundo promotor híbrido, codificando uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção de alanina na posição alfa-12;

(vi) uma segunda sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da primeira sequência de ADN, que compreende a região de terminação da transcrição do gene GAL10;

(vii) um marcador seleccionável URA3 ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(viii) uma origem de replicação plasmídica 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que sejam expressas a cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina fetal, e que compreende uma valina na posição gama-1 e a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, e ligadas conjuntamente com heme, numa célula de levedura, para formar hemoglobina.

63 - Processo de acordo com a reivindicação 62, caracterizado por o vector de ADN recombinante ser o plasmídeo pBM-R-X8-A- $\alpha$  val.

64 - Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18806 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

65 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo, uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga e uma cadeia variante de globina tipo beta ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e em que o segundo vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia variante de globina tipo beta, ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia variante de globina tipo beta, ou um seu fragmento de ligação a heme; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedu-

ra; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado, de modo que a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga e a cadeia variante de globina tipo beta, ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressos e ligados conjuntamente a heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

66 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo, uma cadeia variante de globina tipo alfa, ou um seu fragmento, de ligação a heme, e uma cadeia de globina tipo beta ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia variante de globina tipo alfa ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia variante de globina tipo alfa ou um seu fragmento de ligação a heme; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e em que o segundo vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo beta, ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina tipo beta ou um seu fragmento de ligação a heme; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado, de modo que a cadeia variante de globina tipo alfa ou o seu fragmento, de ligação a heme e a cadeia de globina tipo beta, ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressos e ligados conjuntamente a heme, na célula de levedura, para formar

hemoglobina.

67 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de alfa-globina de adulto, ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de gama-globina ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de alfa-globina de adulto ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia de alfa-globina de adulto ou um seu fragmento de ligação a heme; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e em que o segundo vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de gama-globina, ou um seu fragmento de ligação a heme; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia de gama-globina ou um seu fragmento de ligação a heme; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado, de modo que a cadeia de alfa-globina de adulto ou o seu fragmento, de ligação a heme e a cadeia de gama-globina, ou o seu fragmento de ligação a heme, sejam expressos e ligados conjuntamente a heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

68 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de beta-globina Porto Alegre humana ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de dois vectores de

ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende:

(i) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor híbrido compreendendo um promotor GAL1-10 e um promotor IDH3;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor híbrido, codificando uma cadeia de alfa-globina humana compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12;

(C) um marcador seleccionável URA3 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN codificando a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, que compreende a região de terminação da transcrição do gene GAL10; e

(ii) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de beta-globina Porto Alegre humana, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor GAL10;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de beta-globina Porto Alegre humana;

(C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que sejam expressos a cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção de alanina na posição alfa-12 ou o seu fragmento de ligação a heme e a cadeia de beta-globina Porto Alegre humana, ou o seu fragmento de ligação a heme, e ligados conjuntamente com heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

69 - Processo de acordo com a reivindicação 68, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18807 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

70 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de gama-globina ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende:

(i) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor híbrido compreendendo um promotor GAL1-10 e um promotor IDH3;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor híbrido, codificando uma cadeia de alfa-globina humana compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12;

(C) um marcador seleccionável URA3 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2µ ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN codificando a cadeia de alfa globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, que compreende a região de terminação da transcrição do gene GAL10; e

(ii) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de gama-globina de feto humano, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor GAL10;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do

promotor GAL10, codificando uma cadeia de gama-globina de feto humano;

(C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de gama-globina fetal, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que sejam expressos a cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 ou o seu fragmento de ligação a heme e a cadeia de gama-globina de feto humano, ou o seu fragmento de ligação a heme, e ligados em conjunto com heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

71 - Processo de acordo com a reivindicação 71, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18792 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

72 - Processo para a produção de uma hemoglobina compreendendo uma cadeia de cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de zeta-globina de embrião humano, e que compreende uma asparagina na posição zeta-94 ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de gama-globina ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende:

(i) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de zeta-globina de embrião humano, e que compreende uma asparagina na posição zeta-

-94, compreendendo:

- (A) um promotor GAL10;
- (B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando a cadeia de globina variante;
- (C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa;
- (D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool desidrogenase I; e

(ii) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de gama-globina de feto humano, numa célula de levedura, compreendendo:

- (A) um promotor GAL10;
- (B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de gama-globina de feto humano;

(C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de gama-globina fetal, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que sejam expressos a cadeia de cadeia de globina variante que é substancialmente homóloga a uma cadeia de zeta-globina de embrião humano, e que compreende uma asparagina na posição zeta-94 ou o seu fragmento de ligação a heme e a cadeia de gama-globina de feto humano, ou o seu fragmento de ligação a heme, e ligados em conjunto com heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

73 - Processo de acordo com a reivindicação 72, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces.

cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18808 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

74 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma de cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma cisteína na posição gama-9, ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende:

(i) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor híbrido compreendendo um promotor GAL1-10 e um promotor IDH3;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor híbrido, codificando uma cadeia de alfa-globina de humana, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12;

(C) um marcador seleccionável URA3 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2µ ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, que compreende a região de terminação da transcrição do gene GAL10; e

(ii) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma cisteína na posição gama-9,

compreendendo:

- (A) um promotor GAL10;
- (B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma cisteína na posição gama-9;
- (C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa;
- (D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e
- (E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que sejam expressas a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 e uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma cisteína na posição gama-9, e ligadas conjuntamente com heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

75 - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18800 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

76 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma de cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma valina na posição gama-1, ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante

compreende:

(i) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor híbrido compreendendo um promotor GAL1-10 e um promotor IDH3;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor híbrido, codificando uma cadeia de alfa-globina humana, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12;

(C) um marcador seleccionável URA3 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, que compreende a região de terminação da transcrição do gene GAL10; e

(ii) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, substancialmente homóloga a uma cadeia variante de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma valina na posição gama-1, compreendendo:

(A) um promotor GAL10;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma valina na posição gama-1;

(C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de

modo que sejam expressas a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 e uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma valina na posição gama-1, e ligadas conjuntamente com heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

77 - Processo de acordo com a reivindicação 76, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso Y-18793 ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

78 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma de cadeia de alfa-globina de adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 ou um seu fragmento de ligação a heme, e uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma treonina na posição gama-66, ou um seu fragmento de ligação a heme, numa célula de levedura, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introdução, numa célula de levedura, de dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende:

(i) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir uma cadeia de alfa-globina de ser humano adulto compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, numa célula de levedura, compreendendo:

(A) um promotor híbrido compreendendo um promotor GAL1-10 e um promotor IDH3;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor híbrido, codificando uma cadeia de alfa-globina humana, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12;

(C) um marcador seleccionável URA3 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição

localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12, que compreende a região de terminação da transcrição do gene GAL10; e

(ii) um vector de ADN recombinante capaz de exprimir, numa célula de levedura, uma cadeia de globina variante, substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma treonina na posição gama-66, compreendendo:

(A) um promotor GAL10;

(B) uma sequência de ADN localizada a jusante do promotor GAL10, codificando uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma treonina na posição gama-66;

(C) um marcador seleccionável LEU2 ou uma sua porção funcionalmente activa;

(D) um sistema de replicação plasmídico 2 $\mu$  ou uma sua porção funcionalmente activa; e

(E) uma sequência de terminação da transcrição localizada a jusante da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina variante, que compreende a região de terminação da transcrição do gene da álcool-desidrogenase I; e

(b) cultivar a célula de levedura num meio apropriado de modo que sejam expressas a cadeia de alfa-globina de ser humano adulto, compreendendo uma deleção da alanina na posição alfa-12 e uma cadeia de globina variante substancialmente homóloga a uma cadeia de gama-globina de feto humano, e compreendendo uma treonina na posição gama-66, e ligadas conjuntamente com heme, na célula de levedura, para formar hemoglobina.

79 - Processo de acordo com a reivindicação 78, caracterizado por a célula de levedura ser uma Saccharomyces cerevisiae tal como depositada no NRRL com o nº de acesso ou um seu derivado mutante, recombinante ou obtido por engenharia genética.

80 - Processo para a produção de hemoglobina compreendendo uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancial-

mente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga, e uma cadeia de globina tipo beta ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga, caracterizado por compreender os passos de:

(a) introduzir, numa célula de levedura, dois vectores de ADN recombinante, em que o primeiro vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo alfa, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN que codifica a cadeia de globina tipo alfa ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou de uma sua variante substancialmente homóloga; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura, ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e em que o segundo vector de ADN recombinante compreende: (i) uma sequência de ADN codificando uma cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga; (ii) um promotor transcricional de levedura, o qual promove a transcrição da sequência de ADN, que codifica a cadeia de globina tipo beta, ou uma sua variante substancialmente homóloga, ou um fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou de uma sua variante substancialmente homóloga; e (iii) uma sequência de ADN codificando pelo menos um marcador seleccionável de levedura, ou uma sua porção funcionalmente activa; e (iv) uma origem de replicação de levedura; e

(b) cultivar a célula de levedura de modo que sejam expressos a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente

homóloga, e a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga;

(c) isolar, da célula de levedura, a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga e a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga; e

(d) combinar, com uma fonte de heme, a cadeia de globina tipo alfa, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo alfa ou da sua variante substancialmente homóloga, e a cadeia de globina tipo beta, ou a sua variante substancialmente homóloga, ou o fragmento, de ligação a heme, da cadeia de globina tipo beta ou da sua variante substancialmente homóloga.

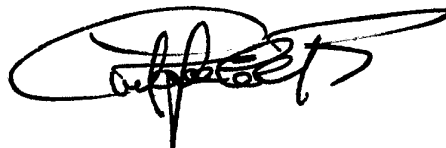
81 - Processo de preparação de uma composição de hemoglobina caracterizado por se associar uma hemoglobina, produzida de acordo com o processo das reivindicações 57 a 80 com um portador farmacêuticamente aceitável.

Lisboa,

16. ABR. 1991

Por STROHTECH INC.

= O AGENTE OFICIAL =



ZETA-GLOBINA DE EMBRIÃO

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | TCT | CTG | ACC | AAG | ACT | GAG | AGG | ACC | ATC | ATT | GTG | TCC | ATG | TGG | GCC | AAG | ATC | 51  |
| 1   | Ser | Leu | Thr | Lys | Thr | Glu | Arg | Thr | Ile | Ile | Val | Ser | Met | Trp | Ala | Lys | Ile | 17  |
| 52  | TCC | ACG | CAG | GCC | GAC | ACC | ATC | GGC | ACC | GAG | ACT | CTG | GAG | AGG | CTC | TTC | CTC | 102 |
| 18  | Ser | Thr | Gln | Ala | Asp | Thr | Ile | Gly | Thr | Glu | Thr | Leu | Glu | Arg | Leu | Phe | Leu | 34  |
| 103 | AGC | CAC | CCG | CAG | ACC | AAG | ACC | TAC | TTC | CCG | CAC | TTC | GAC | CTG | CAC | CCG | GGG | 153 |
| 35  | Ser | His | Pro | Gln | Thr | Lys | Thr | Tyr | Phe | Pro | His | Phe | Asp | Leu | His | Pro | Gly | 51  |
| 154 | TCC | GCG | CAG | TTG | CGC | GCG | CAC | GGC | TCC | AAG | GTG | GTG | GCC | GCC | GTG | GGC | GAC | 204 |
| 52  | Ser | Ala | Gln | Leu | Arg | Ala | His | Gly | Ser | Lys | Val | Val | Ala | Ala | Val | Gly | Asp | 68  |
| 205 | GCG | GTG | AAG | AGC | ATC | GAC | GAC | ATC | GGC | GGC | GCC | CTG | TCC | AAG | CTG | AGC | GAG | 255 |
| 69  | Ala | Val | Lys | Ser | Ile | Asp | Asp | Ile | Gly | Gly | Ala | Leu | Ser | Lys | Leu | Ser | Glu | 85  |
| 256 | CTG | CAC | GCC | TAC | ATC | CTG | CGC | GTG | GAC | CCG | GTC | AAC | TTC | AAG | CTC | CTG | TCC | 306 |
| 86  | Leu | His | Ala | Tyr | Ile | Leu | Arg | Val | Asp | Pro | Val | Asn | Phe | Lys | Leu | Leu | Ser | 102 |
| 307 | CAC | TGC | CTG | CTG | GTC | ACC | CTG | GCC | GCG | CGC | TTC | CCC | GCC | GAC | TTC | ACG | GCC | 357 |
| 103 | His | Cys | Leu | Leu | Val | Thr | Leu | Ala | Ala | Arg | Phe | Pro | Ala | Asp | Phe | Thr | Ala | 119 |
| 358 | GAG | GCC | CAC | GCC | GCC | TGG | GAC | AAG | TTC | CTA | TCG | GTC | GTA | TCC | TCT | GTC | CTG | 408 |
| 120 | Glu | Ala | His | Ala | Ala | Trp | Asp | Lys | Phe | Leu | Ser | Val | Val | Ser | Ser | Val | Leu | 136 |
| 409 | ACC | GAG | AAG | TAC | CGC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 423 |
| 137 | Thr | Glu | Lys | Tyr | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 141 |

FIG. 1A

EPSILON-GLOBINA DE EMBRIÃO

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | GTG | CAT | TTT | ACT | GCT | GAG | GAG | AAG | GCT | GCC | GTC | ACT | AGC | CTG | TGG | AGC | AAG | 51  |
| 1   | Val | His | Phe | Thr | Ala | Glu | Glu | Lys | Ala | Ala | Val | Thr | Ser | Leu | Trp | Ser | Lys | 17  |
| 52  | ATG | AAT | GTG | GAA | GAG | GCT | GGA | GGT | GAA | GCC | TTG | GGC | AGG | CTC | CTC | GTT | GTT | 102 |
| 18  | Met | Asn | Val | Glu | Glu | Ala | Gly | Gly | Glu | Ala | Leu | Gly | Arg | Leu | Leu | Val | Val | 34  |
| 103 | TAC | CCC | TGG | ACC | CAG | AGA | TTT | TTT | GAC | AGC | TTT | GGA | AAC | CTG | TCG | TCT | CCC | 153 |
| 35  | Tyr | Pro | Trp | Thr | Gln | Arg | Phe | Phe | Asp | Ser | Phe | Gly | Asn | Leu | Ser | Ser | Pro | 51  |
| 154 | TCT | GCC | ATC | CTG | GGC | AAC | CCC | AAG | GTC | AAG | GCC | CAT | GGC | AAG | AAG | GTG | CTG | 204 |
| 52  | Ser | Ala | Ile | Leu | Gly | Asn | Pro | Lys | Val | Lys | Ala | His | Gly | Lys | Lys | Val | Leu | 68  |
| 205 | ACT | TCC | TTT | GGA | GAT | GCT | ATT | AAA | AAC | ATG | GAC | AAC | CTC | AAG | CCC | GCC | TTT | 255 |
| 69  | Thr | Ser | Phe | Gly | Asp | Ala | Ile | Lys | Asn | Met | Asp | Asn | Leu | Lys | Pro | Ala | Phe | 85  |
| 256 | GCT | AAG | CTG | AGT | GAG | CTG | CAC | TGT | GAC | AAG | CTG | CAT | GTG | GAT | CCT | GAG | AAC | 306 |
| 86  | Ala | Lys | Leu | Ser | Glu | Glu | Leu | His | Cys | Asp | Lys | Leu | His | Val | Asp | Pro | Glu | 102 |
| 307 | TTC | AAG | CTC | CTG | GGT | AAC | GTG | ATG | GTG | ATT | ATT | CTG | GCT | ACT | CAC | TTT | GGC | 357 |
| 103 | Phe | Lys | Leu | Leu | Gly | Asn | Val | Met | Val | Ile | Ile | Leu | Ala | Thr | His | Phe | Gly | 119 |
| 358 | AAG | GAG | TTC | ACC | CCT | GAA | GTG | CAG | GCT | GCC | TGG | CAG | AAG | CTG | GTG | TCT | GCT | 408 |
| 120 | Lys | Glu | Phe | Thr | Pro | Glu | Val | Gln | Ala | Ala | Trp | Gln | Lys | Leu | Val | Ser | Ala | 136 |
| 409 | GTC | GCC | ATT | GCC | CTG | GGC | CAT | AAG | TAC | CAC |     |     |     |     |     |     |     | 438 |
| 137 | Val | Ala | Ile | Ala | Leu | Gly | His | Lys | Tyr | His |     |     |     |     |     |     |     | 146 |

FIG. 1B

CAMA-GLOBINA DE FEITO

|     |                                                                         |     |
|-----|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | GGT CAT TTC ACA GAG GAG GAC AAG GCT ACT ATC ACA AGC CTG TGG GGC AAG     | 51  |
| 1   | Gly His Phe Thr Glu Glu Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ser Leu Trp Gly Lys     | 17  |
| 52  | GTG AAT GTG GAA GAT GCT GGA GGA ACC CTG GGA AGG CTC CTG GTT GTC         | 102 |
| 18  | Val Asn Val Glu Asp Ala Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu Val Val         | 34  |
| 103 | TAC CCA TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAC AGC TTT GGC AAC CTG TCC TCT GCC     | 153 |
| 35  | Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Ser Phe Gly Asn Leu Ser Ser Ala     | 51  |
| 154 | TCT GCC ATC ATG GGC AAC CCC AAA GTC AAG GCA CAT GGC AAG AAG GTG CTG     | 204 |
| 52  | Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His Gly Lys Val Leu         | 68  |
| 205 | ACT TCC TTG GGA GAT GCC ATA AAG CAC CTG GAT GAT CTC AAG GGC ACC TTT     | 255 |
| 69  | Thr Ser Leu Gly Asp Ala Ile Lys His Leu Asp Asp Leu Lys Gly Thr Phe     | 85  |
| 256 | GCC CAG CTG AGT GAA CTG CAC TGT GAC AAG CTG CAT GTG GAT CCT GAG AAC     | 306 |
| 86  | Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu His Val Asp Pro Glu Asn     | 102 |
| 307 | TTC AAG CTC CTG GGA AAT GTG CTG GTG ACC GTT TTG GCA ATC CAT TTC GGC     | 357 |
| 103 | Phe Lys Leu Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Thr Val Leu Ala Ile His Phe Gly | 119 |
| 358 | AAA GAA TTC ACC CCT GAG GTG CAG GCT TCC TGG CAG AAG ATG GTG ACT GCA     | 408 |
| 120 | Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln Ala Ser Trp Gln Lys Met Val Thr Ala     | 136 |
| 409 | GTG GCC AGT GCC CTG TCC TCC AGA TAC CAC                                 | 438 |
| 137 | Val Ala Ser Ala Leu Ser Ser Arg Tyr His                                 | 146 |

FIG. 1C

DELTA-S/COBINA DE ADULTO

|     |                                                                     |     |
|-----|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | GTG CAT CTG ACT CCT GAG GAG AAG ACT GCT GTC AAT GCC CTG TGG GGC AAA | 51  |
| 1   | Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr Ala Val Asn Ala Leu Trp Gly Lys | 17  |
| 52  | GTG AAC GTG GAT GCA GTG GGT GGT GAG GCC CTG GGC AGG TTA CTG GTG GTC | 102 |
| 18  | Val Asn Val Asp Ala Val Glu Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Val Val | 34  |
| 103 | TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC TTT GGG GAT CTG TCC TCT CCT | 153 |
| 35  | Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu Ser Ser Pro | 51  |
| 154 | GAT GCT GTT ATG GGC AAC CCT AAG GTG AAG GCT CAT GGC AAG AAG GTG CTA | 204 |
| 52  | Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His Gly Lys Lys Val Leu | 68  |
| 205 | GGT GCC TTT AGT GAT GGC CTG GCT CAC CTG GAC AAC CTC AAG GGC ACT TTT | 255 |
| 69  | Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn Leu Lys Gly Thr Phe | 85  |
| 256 | TCT CAG CTG AGT GAG CTG CAC TGT GAC AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC | 306 |
| 86  | Ser Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu His Val Asp Pro Glu Asn | 102 |
| 307 | TTC AGG CTC TTG GGC AAT GTG CTG TGT GTG CTG GCC CGC AAC TTT GGC     | 357 |
| 103 | Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Cys Val Leu Ala Arg Asn Phe Gly     | 119 |
| 358 | AAG GAA TTC ACC CCA CAA ATG CAG GCT GCC TAT CAG AAG GTG GTG GCT GGT | 408 |
| 120 | Lys Glu Phe Thr Pro Gln Met Gln Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly | 136 |
| 409 | GTC GCT AAT GCC TTG GCT CAC AAG TAC CAT                             | 438 |
| 137 | Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys Tyr His                             | 146 |

FIG. 1D

ALFA-GLOBINA DE ADULTO

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | GTG | CTG | TCT | CCT | GCC | GAC | AAG | ACC | AAC | GTC | AAG | GCC | GCC | TGG | GGC | AAG | GTT | 51  |
| 1   | Val | Leu | Ser | Pro | Ala | Asp | Lys | Thr | Asn | Val | Lys | Ala | Ala | Trp | Gly | Lys | Val | 17  |
| 52  | GGC | GCG | CAC | GCT | GGC | GAG | TAT | GGT | GCG | GAG | GCC | CTG | GAG | AGG | ATG | TTC | CTG | 102 |
| 18  | Gly | Ala | His | Ala | Gly | Glu | Tyr | Gly | Ala | Glu | Ala | Leu | Glu | Arg | Met | Phe | Leu | 34  |
| 103 | TCC | TTC | CCC | ACC | ACC | AAG | ACC | TAC | TTC | CCG | CAC | TTC | GAC | CTG | AGC | CAC | GGC | 153 |
| 35  | Ser | Phe | Pro | Thr | Thr | Lys | Thr | Tyr | Phe | Pro | His | Phe | Asp | Leu | Ser | His | Gly | 51  |
| 154 | TCT | GCC | CAG | GTT | AAG | GGC | CAC | GGC | AAG | GTG | GCC | GCC | GAC | GCG | CTG | ACC | AAC | 204 |
| 52  | Ser | Ala | Gln | Val | Lys | Gly | His | Gly | Lys | Val | Ala | Ala | Asp | Ala | Leu | Thr | Asn | 68  |
| 205 | GCC | GTG | GCG | CAC | GTG | GAC | GAC | ATG | CCC | AAC | GCG | CTG | TCC | GCC | CTG | AGC | GAC | 255 |
| 69  | Ala | Val | Ala | His | Val | Asp | Asp | Met | Pro | Asn | Ala | Leu | Ser | Ala | Leu | Ser | Asp | 85  |
| 256 | CTG | CAC | GCG | CAC | AAG | CTT | CGG | GTG | GAC | CCG | GTC | AAC | TTC | AAG | CTC | CTA | AGC | 306 |
| 86  | Leu | His | Ala | Ala | His | Lys | Leu | Arg | Val | Asp | Pro | Val | Asn | Phe | Lys | Leu | Ser | 102 |
| 307 | CAC | TGC | CTG | CTG | GTG | ACC | CTG | GCC | GCC | CAC | CTC | CCC | GCC | GAG | TTC | ACC | CCT | 357 |
| 103 | His | Cys | Leu | Leu | Val | Thr | Leu | Ala | Ala | His | Leu | Pro | Ala | Glu | Phe | Thr | Pro | 119 |
| 358 | GCG | GTG | CAC | GCC | TCC | CTG | GAC | AAG | TTC | CTG | GCT | TCT | GTG | AGC | ACC | GTG | CTG | 408 |
| 120 | Ala | Val | His | Ala | Ser | Leu | Asp | Lys | Phe | Leu | Ala | Ser | Val | Ser | Thr | Val | Leu | 136 |
| 409 | ACC | TCC | AAA | TAC | CGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 423 |
| 137 | Thr | Ser | Lys | Tyr | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 141 |

FIG. 1E

BETA-GLOBINA DE ADULTO.

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | GTG | CAC | CTG | ACT | CCT | GAG | GAG | AAG | TCT | GCC | GTT | ACT | GCC | CTG | TGG | GGC | AAG | 51  |
| 1   | Val | His | Leu | Thr | Pro | Glu | Glu | Lys | Ser | Ala | Val | Thr | Ala | Leu | Trp | Gly | Lys | 17  |
| 52  | GTG | AAC | GTG | GAT | GAA | GTT | GGT | GAG | GCC | CTG | GGC | AGG | CTG | CTG | GTG | GTG | GTC | 102 |
| 18  | Val | Asn | Val | Asp | Glu | Val | Gly | Gly | Ala | Leu | Ala | Leu | Arg | Leu | Leu | Val | Val | 34  |
| 103 | TAC | CCT | TGG | ACC | CAG | AGG | TTC | TTT | GAG | TCC | TTT | GGG | GAT | CTG | TCC | ACT | CCT | 153 |
| 35  | Tyr | Pro | Trp | Thr | Gln | Arg | Phe | Phe | Glu | Ser | Phe | Gly | Asp | Leu | Ser | Thr | Pro | 51  |
| 154 | GAT | GCT | GTT | ATG | GGC | AAC | CCT | AAG | GTG | AAG | GCT | CAT | GGC | AAG | AAA | GTG | CTC | 204 |
| 52  | Asp | Ala | Val | Met | Gly | Asn | Pro | Lys | Val | Lys | Ala | His | Gly | Lys | Lys | Val | Leu | 68  |
| 205 | GGT | GCC | TTT | AGT | GAT | GGC | CTG | GCT | CAC | CTG | GAC | AAC | CTC | AAG | GGC | ACC | TTT | 255 |
| 69  | Gly | Ala | Phe | Ser | Asp | Gly | Leu | Ala | His | Leu | Asp | Asn | Leu | Lys | Gly | Thr | Phe | 85  |
| 256 | GCC | ACA | CTG | AGT | GAG | CTG | CAC | TGT | GAC | AAG | CTG | CAC | GTG | GAT | CCT | GAG | AAC | 306 |
| 86  | Ala | Thr | Leu | Ser | Glu | Leu | His | Cys | Asp | Lys | Leu | His | Val | Asp | Pro | Glu | Asn | 102 |
| 307 | TTC | AGG | CTC | CTG | GGC | AAC | GTG | CTG | GTC | TGT | GTG | CTG | GCC | CAT | CAC | TTT | GGC | 357 |
| 103 | Phe | Arg | Leu | Leu | Gly | Asn | Val | Leu | Val | Cys | Val | Leu | Ala | His | His | Phe | Gly | 119 |
| 358 | AAA | GAA | TTC | ACC | CCA | CCA | GTG | CAG | GCT | GCC | TAT | CAG | AAA | GTG | GTG | GCT | GGT | 408 |
| 120 | Lys | Glu | Phe | Thr | Pro | Pro | Val | Gln | Ala | Ala | Tyr | Gln | Lys | Val | Val | Ala | Gly | 136 |
| 409 | GTG | GCT | AAT | GCC | CTG | GCC | CAC | AAG | TAT | CAC |     |     |     |     |     |     |     | 438 |
| 137 | Val | Ala | Asn | Ala | Leu | Ala | His | Lys | Tyr | His |     |     |     |     |     |     |     | 146 |

FIG. 1F



*[Handwritten signature]*

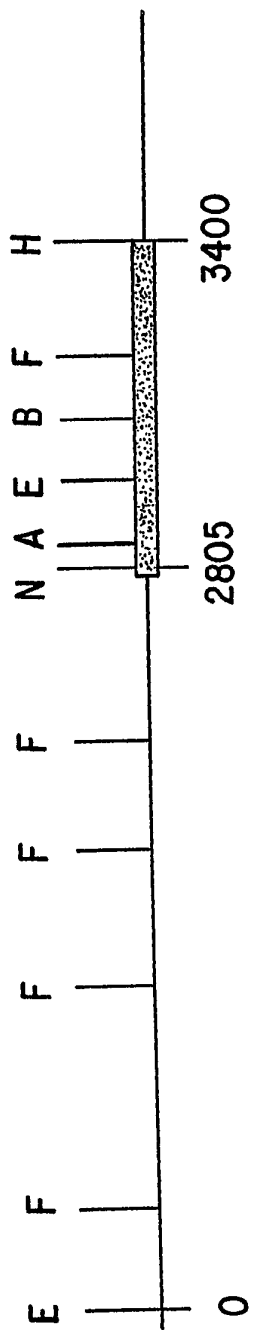


FIG. 2

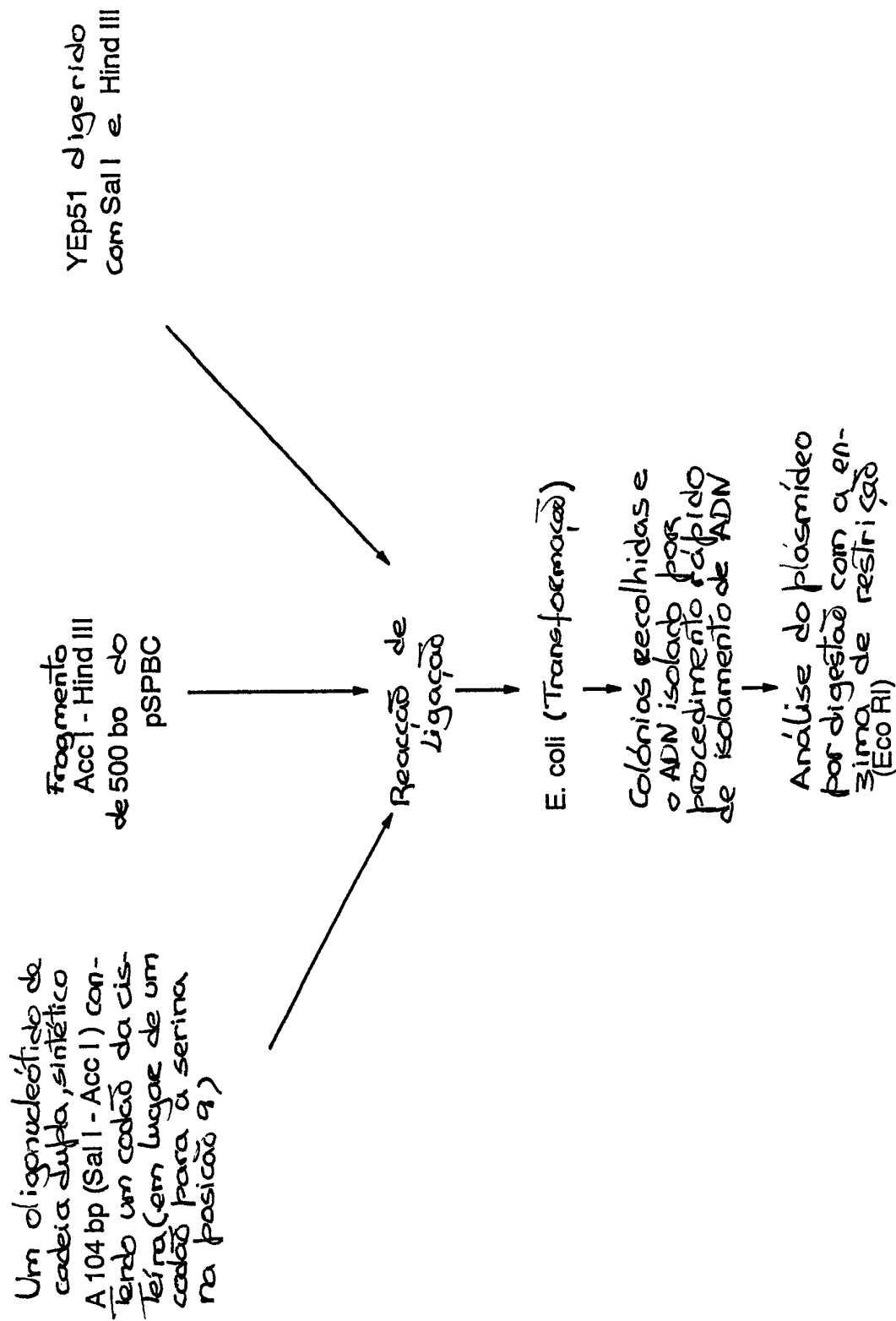


FIG. 3A

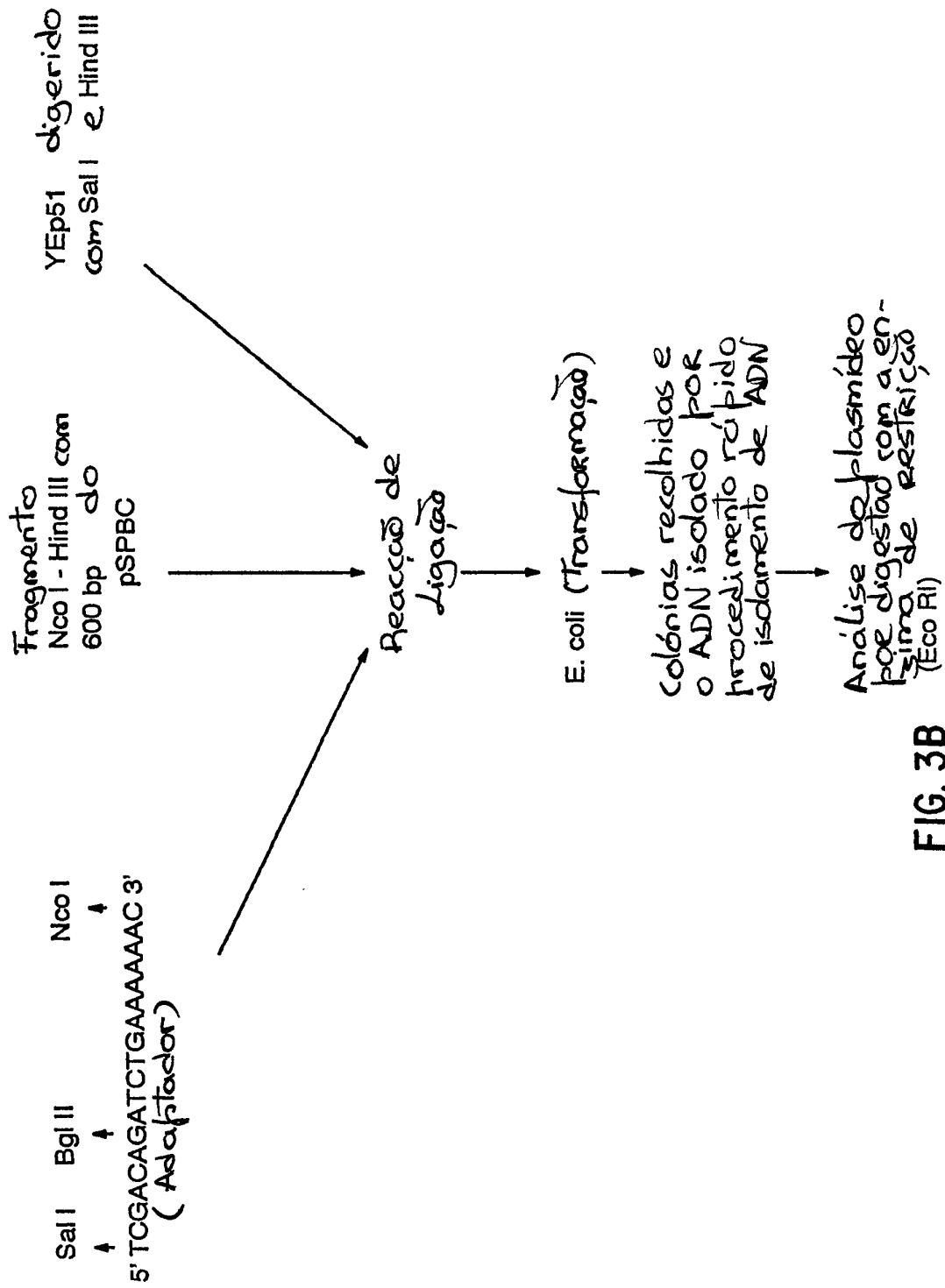
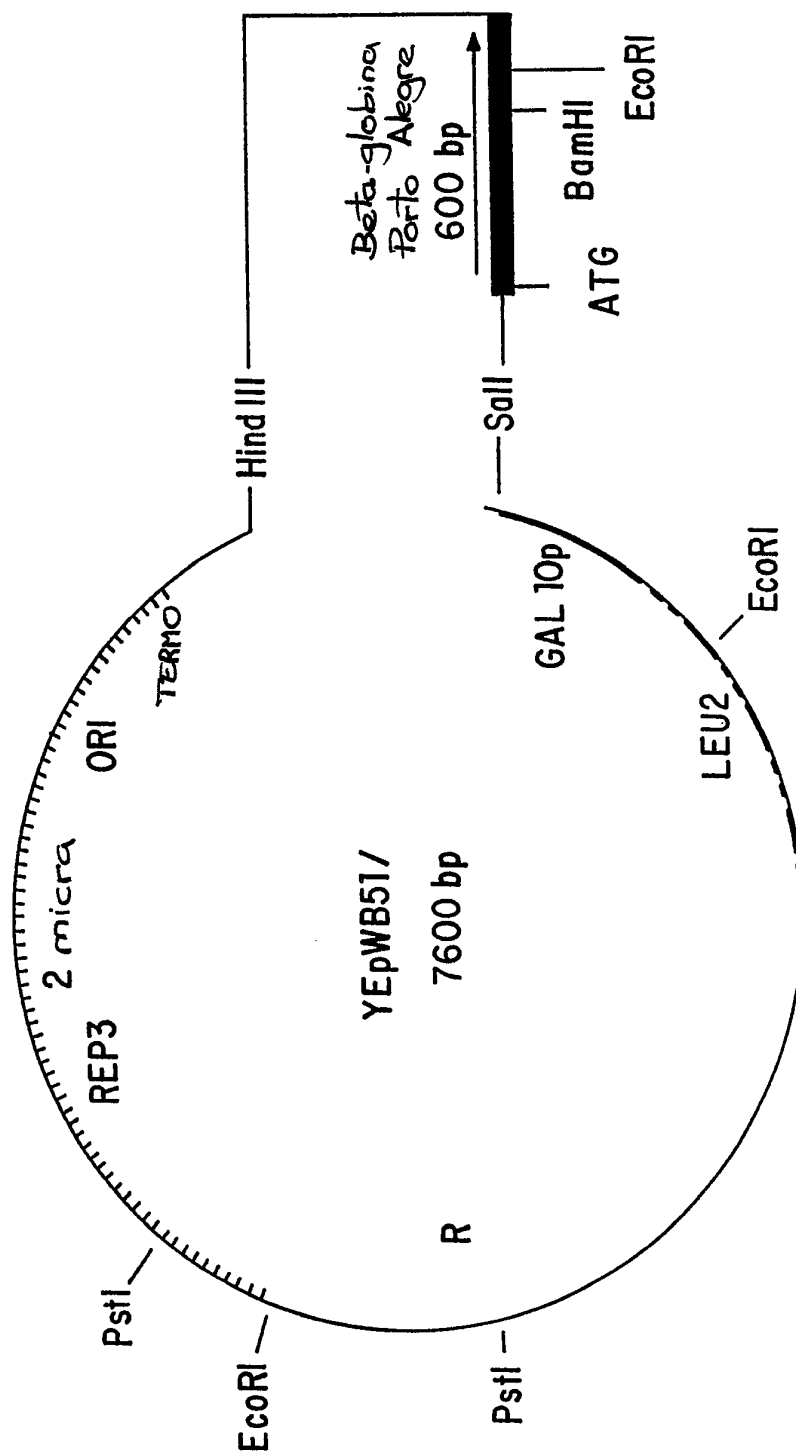


FIG. 3B

*[Handwritten signature]*

FIG. 4



11/62  
●

*[Handwritten signature]*

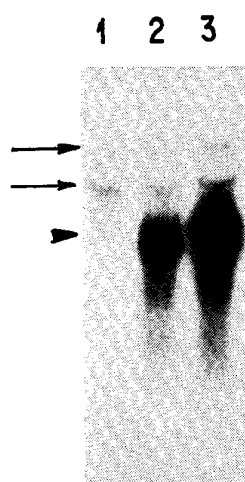


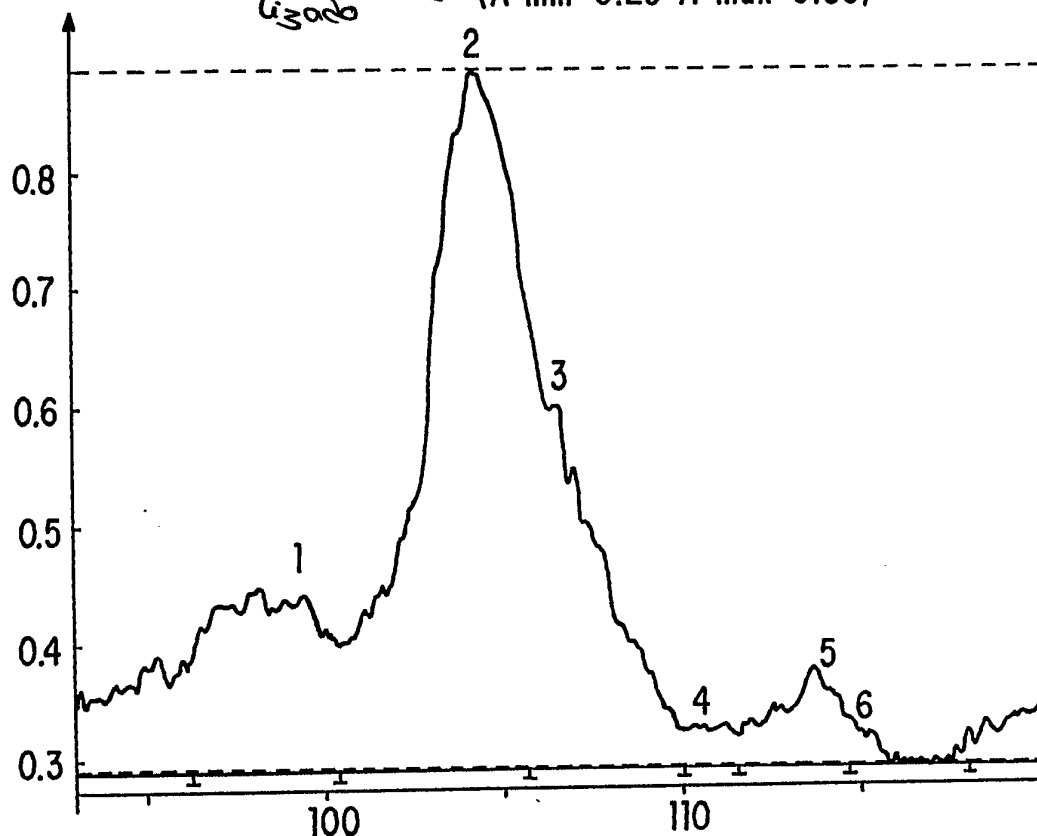
FIG. 5

12/62



*[Handwritten signature]*

Absorvância A-eixo norma  
lizado (A-min=0.29 A-max=0.89)



Y-posição (mm) -----> Y-início=93 Y-fim=120 Y-base=1

FIG. 6A

13/62



*Handwritten signature or initials.*

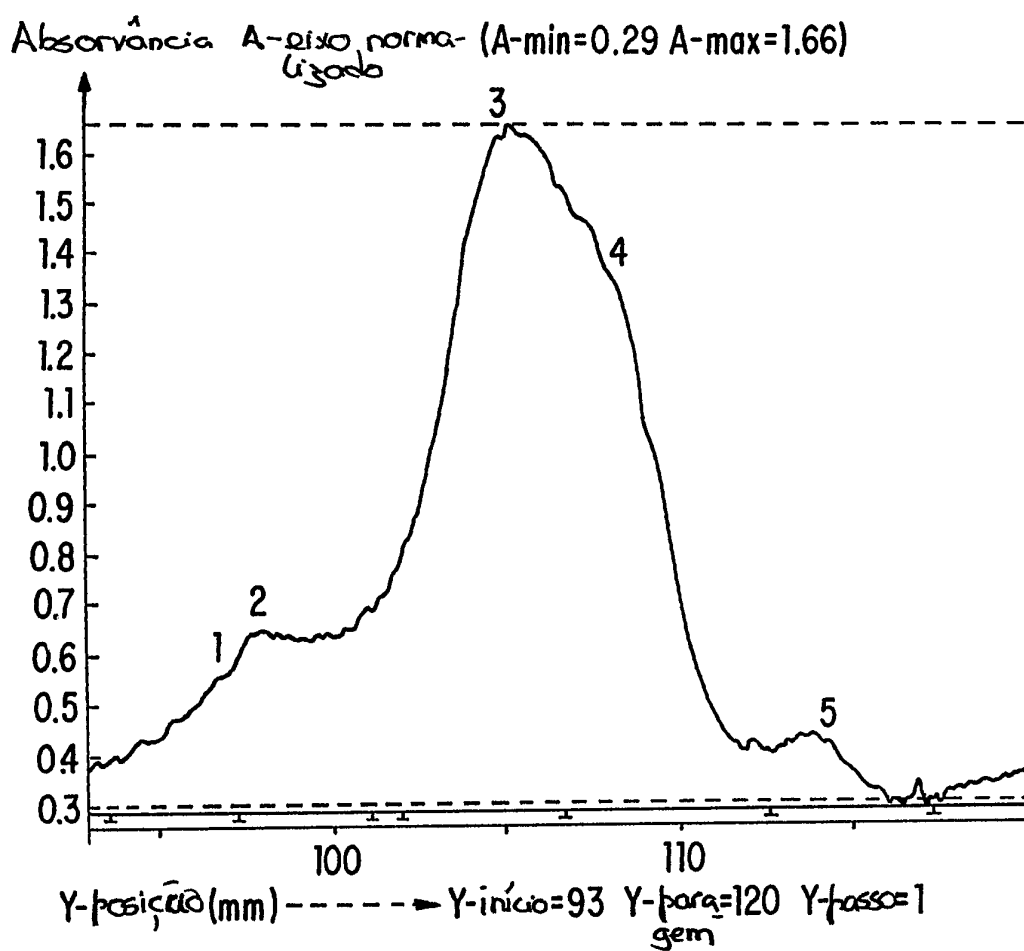


FIG. 6B

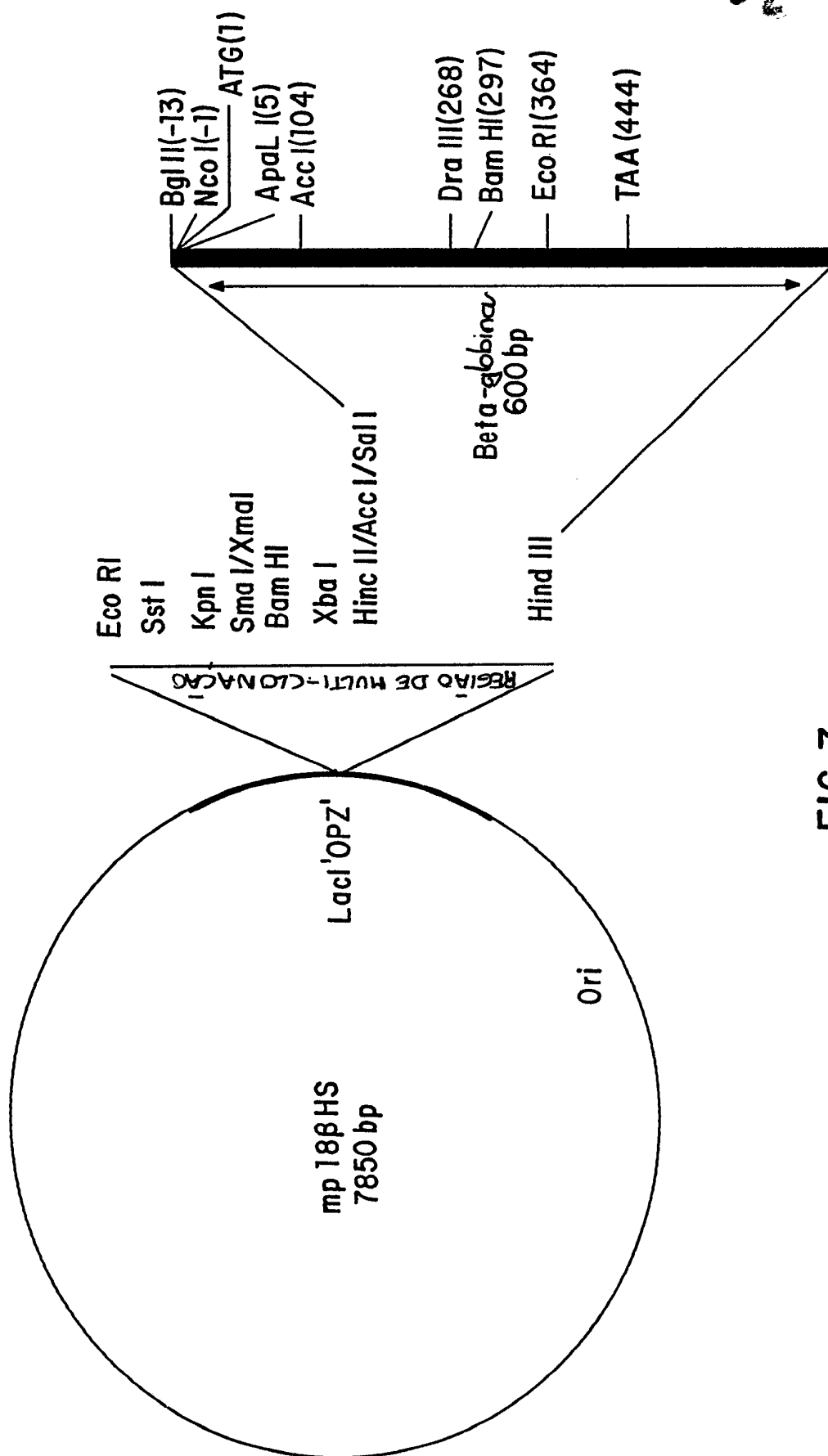


FIG. 7

*[Handwritten signature]*

FIG. 8

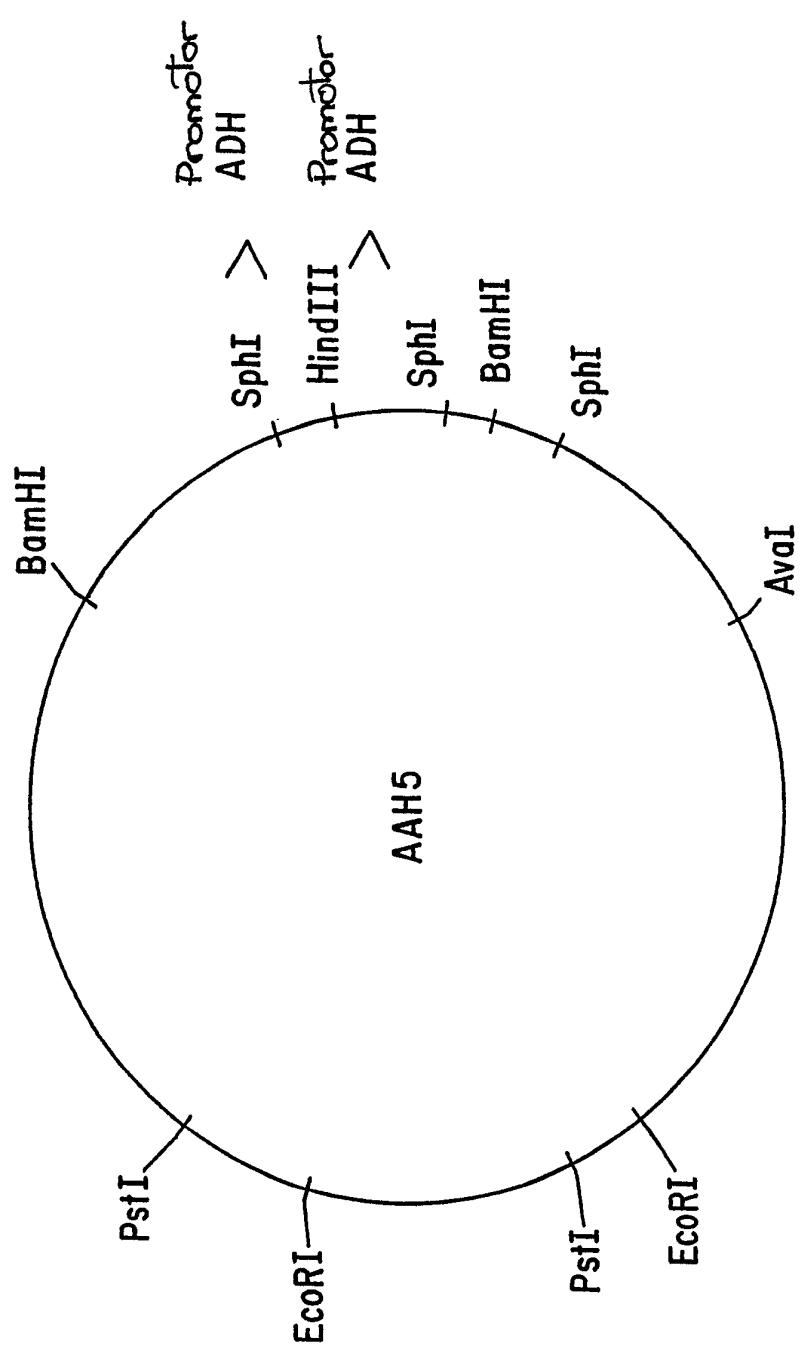




**FIG. 9**

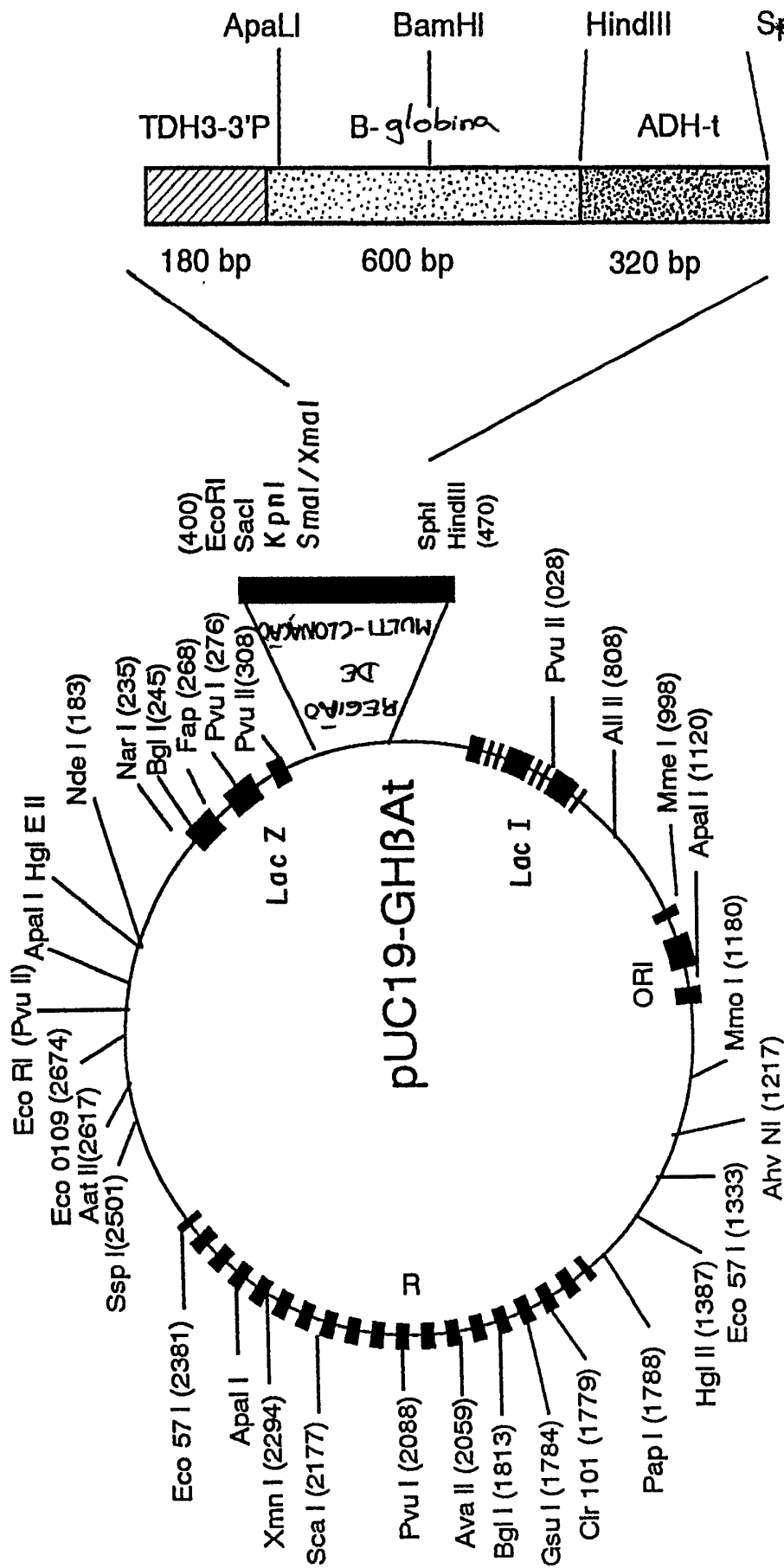


FIG. 10

|               |            |             |            |            |             |    |
|---------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|----|
| 10            | 20         | 30          | Gall-10-5  | 40         | 50          | 60 |
| 5' GATCAAAAAT | CATCGCTTCG | CTGATTAATT  | ACCCAGAAA  | TAAGGCTAAA | AAACTAATCG  |    |
| 70            | 80         | 90          | 100        | 110        | 120         |    |
| CATTATCATC    | CTATGGTTGT | TAAATTTGATT | CGTTTCATTG | AAGGTTTGTG | GGGCCAGGTT  |    |
| 130           | 140        | 150         | 160        | 170        | 180         |    |
| ACTGCCAATT    | TTTCCCTCTC | ATAACCAATA  | AAGCTAGTAT | TGTAGAATCT | TTATTGTTTCG |    |
| 190           | 200        | 210         | 220        | 230        | 240         |    |
| GAGCAGTGCG    | GCGCGAGGCA | CATCTGCGTT  | TCAGGAACGC | GACCGGTGAA | GACGAGGACG  |    |
| 250           | 260        | 270         | 280        | 290        | 300         |    |
| CACGGAGGAG    | AGTCTTCCTT | CGGAGGGCTG  | TCACCCGCTC | GGCGGCTTCT | AATCCGTAAT  |    |
| 310           | 320        | 330         | 340        | 350        | 360         |    |
| TCAATATAGC    | AATGAGCAGT | TAAAGCGTATT | ACTGAAAGTT | CCAAAGAGAA | GGTTTTTTAA  |    |
| 370           | 380        | 390         | 400        | 410        | 420         |    |
| GCTAAGATA     | ATGGGGCTCT | TTACATTTC   | ACAACATATA | AGTAAGATTA | GATATGGATA  |    |
| 430           | 440        | 450         | 460        | 470        | 480         |    |
| TGTATATGGA    | TATGTATATG | GTGGTAATGC  | CATGTAATAT | GATTATATAA | CTTCTTTGCG  |    |
| 490           | 500        | 510         | 520        | 530        | 540         |    |
| TCCATCCAAA    | AAAAAAGTAA | GAATTTTGA   | AAATTCAATA | TAAATGACAG | CTCAGTTACA  |    |
| 550           | 560        | 570         | 580        | 590        | 600         |    |
| AAGTGAAAGT    | ACTTCTAAAA | TTGTTTGTGT  | TACAGGTGGT | GCTGGATACA | TTGGTTCACA  |    |
| 610           | 620        | 630         | 640        | 650        | 660         |    |
| CACTGTGGTA    | GAGCTAATTG | AGAAATGGATA | TGACTGTGTT | GTTGCTGATA | ACCTGTGCGAA |    |

TTC 3'

Sequências GAL-1-10

GAL-1-10-5' - Sequência da extremidade  
5' da GAL-UAS usada na síntese  
do iniciador

GAL-1-10-3' - Sequência da extremidade  
3' da GAL-UAS usada na síntese  
do iniciador

FIG. 11

19/62

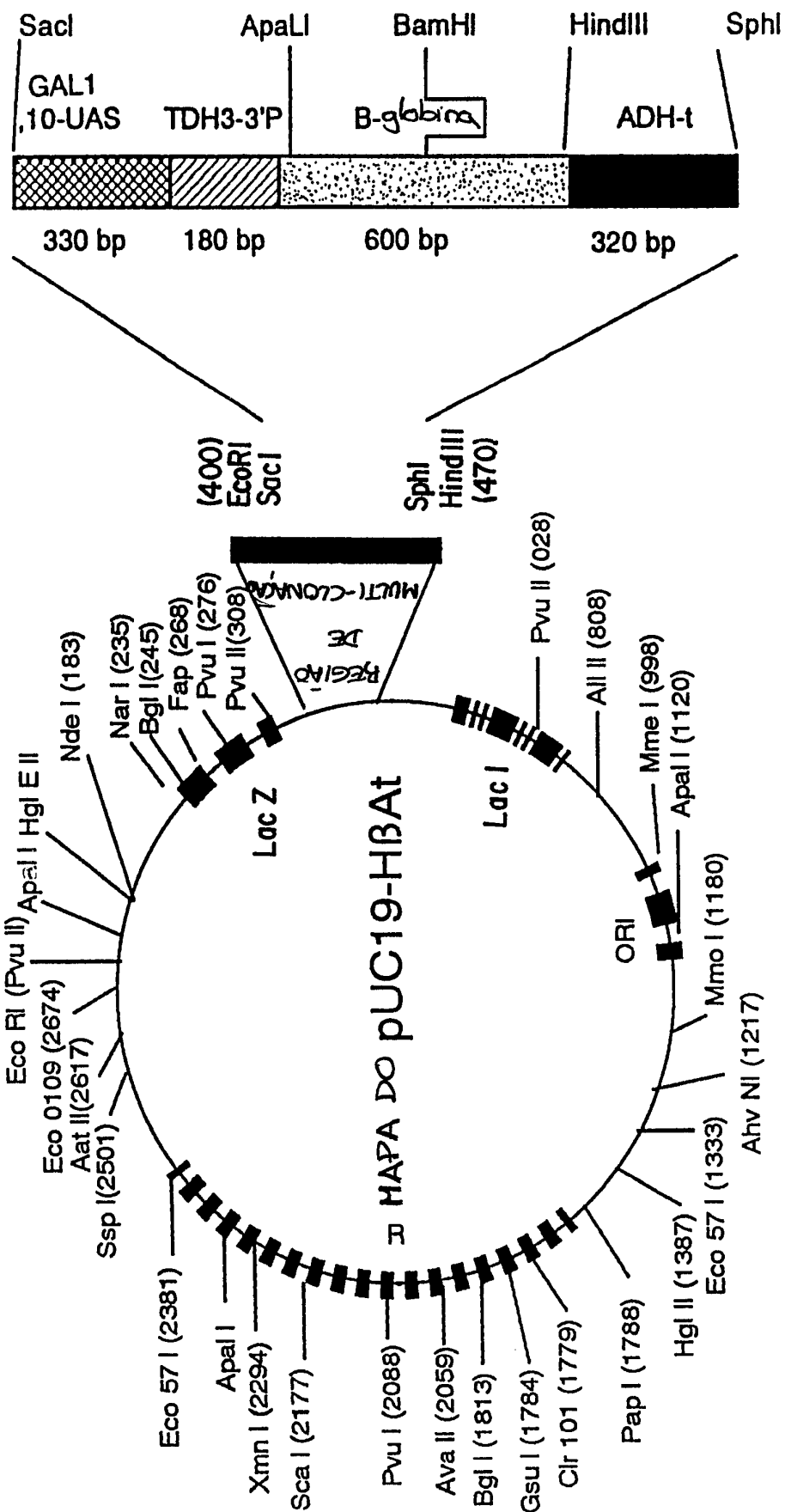


FIG. 12

20/62

*[Handwritten signature]*

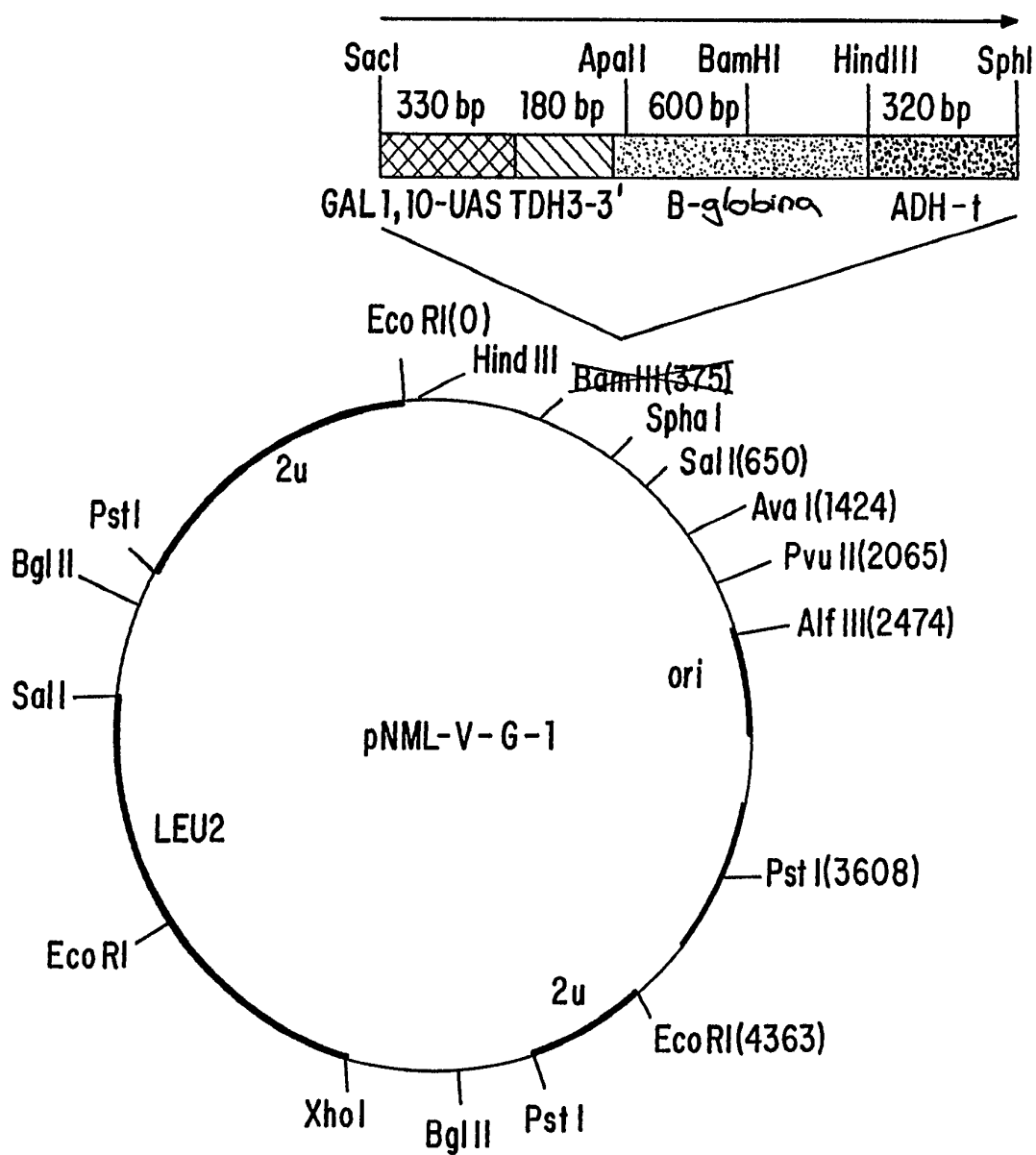
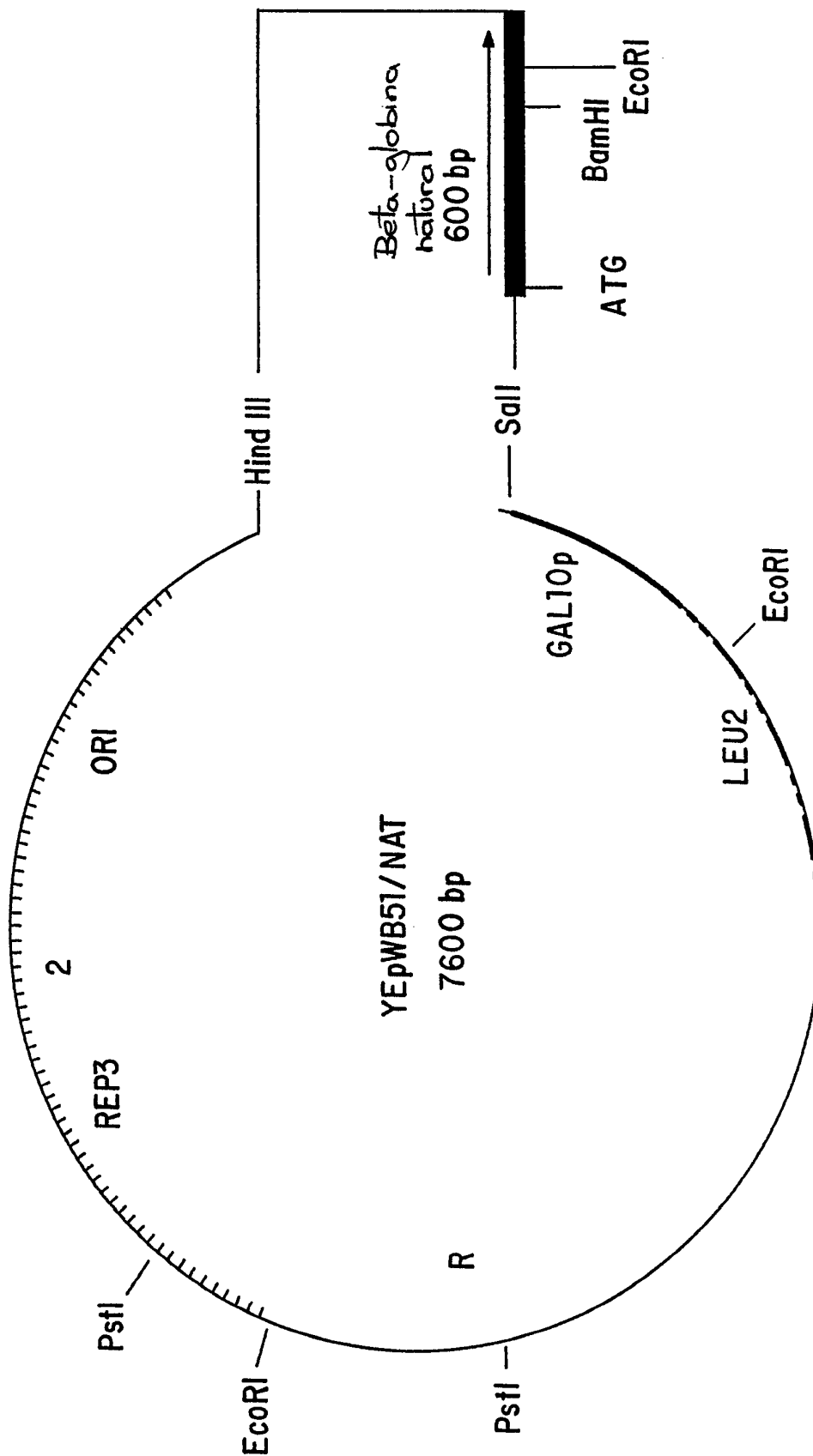


FIG. 13

*[Handwritten signature]*

FIG. 14



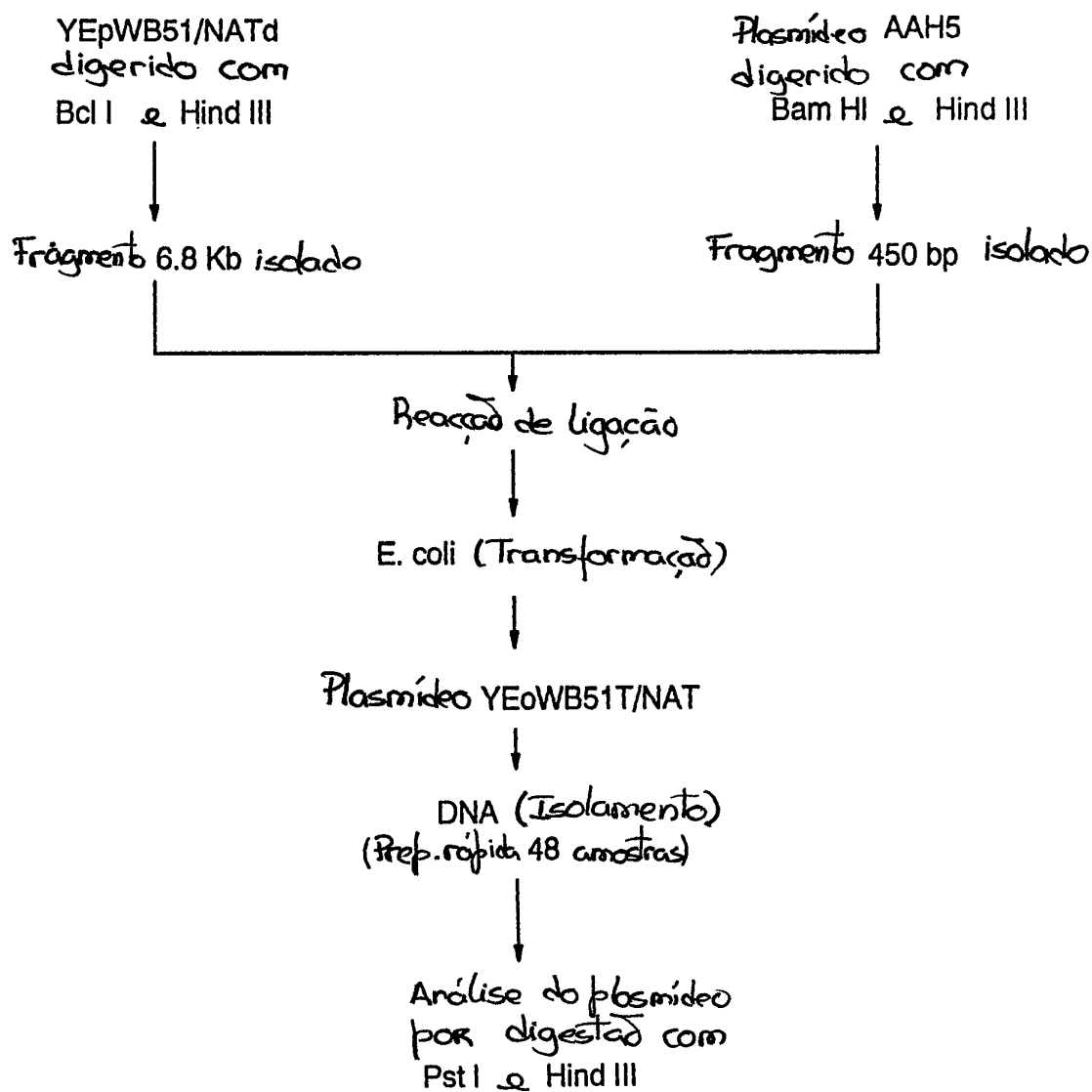
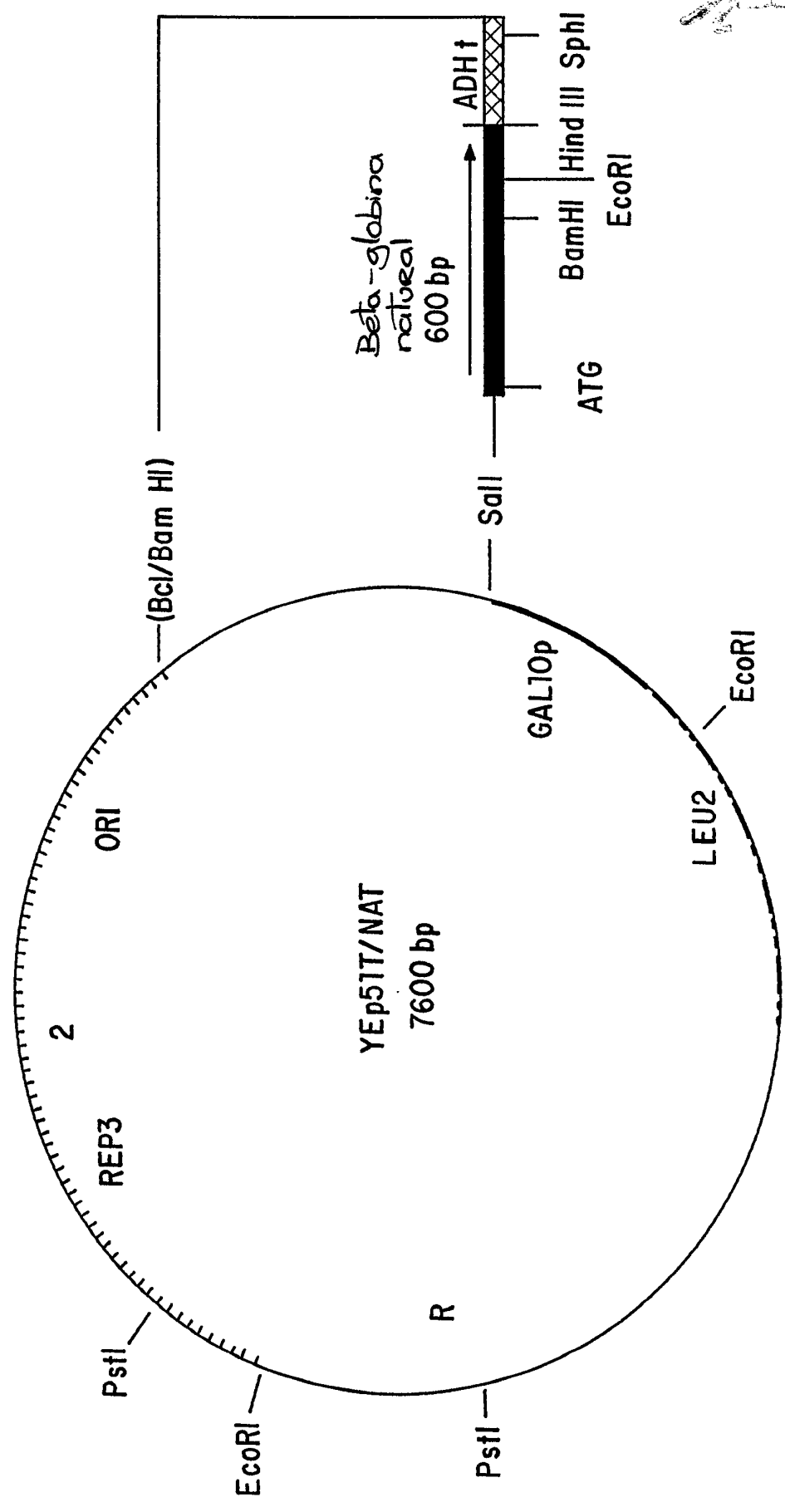


FIG. 15

FIG. 16



*[Handwritten signature]*

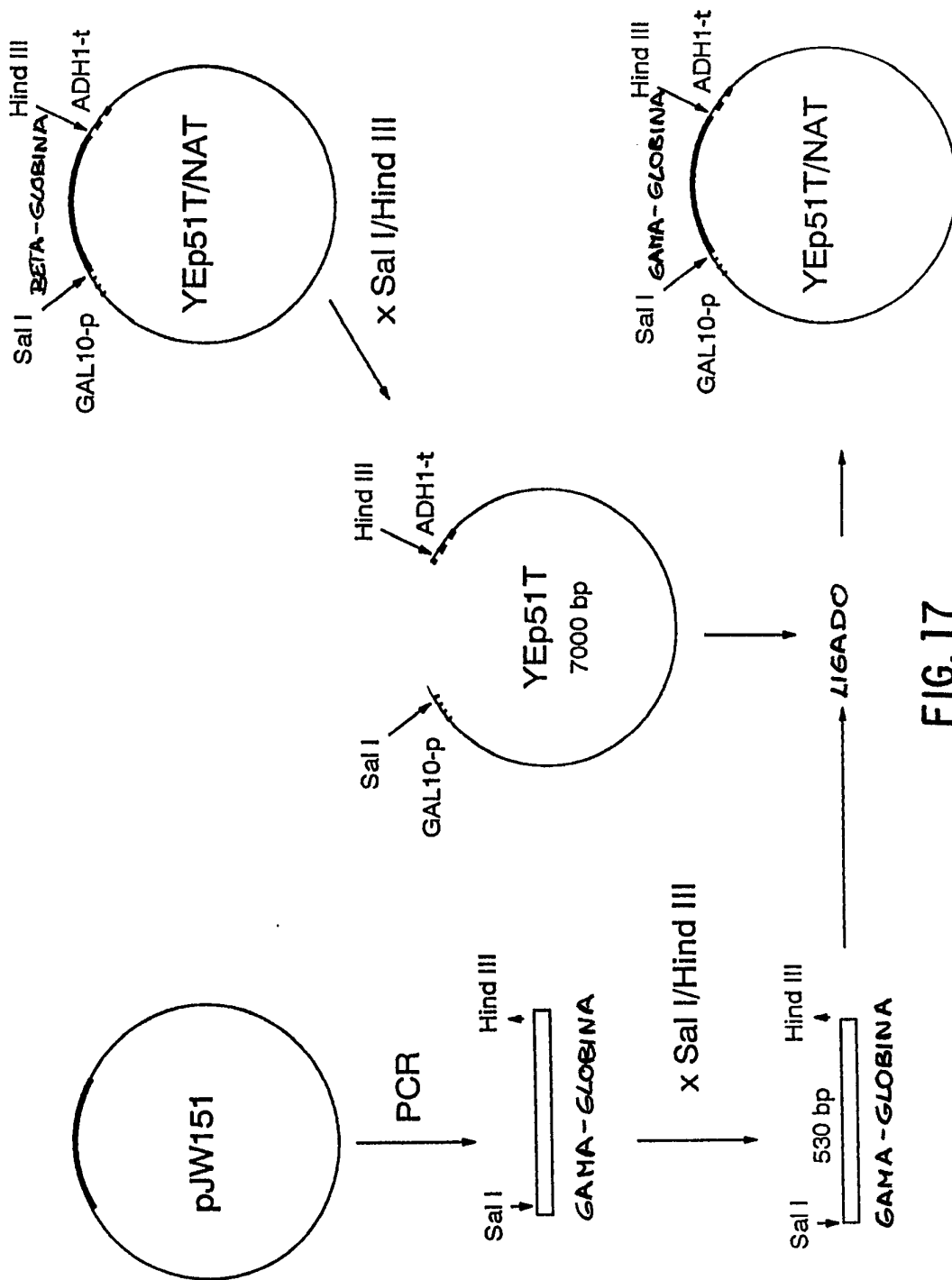


FIG. 17

Nco I 10 20 30 40 50  
 5' CCATGGGTCA TTTACAGAG GAGGACAAGG CTACTATCAC AAGCCTGTGG  
 3' GGTACCCAGT AAAGTGTCTC CTCCTGTTCC GATGATAGTG TTCGGACACC  
  
 60 70 80 90 100  
 GGCAAGGTGA ATGTGGAAGA TGCTGGAGGA GAAACCCTGG GAAGGCTCCT  
 CCGTTCCACT TACACCTTCT ACGACCTCCT CTTTGGGACC CTTCGGAGGA  
  
 110 Nco I 120 130 140 150  
 GGTGTCTAC CCATGGACCC AGAGGTTCTT TGACAGCTTT GGCAACCTGT  
 CCAACAGATG GGTACCTGGG TCTCCAAGAA ACTGTGCGAAA CCGTTGGACA  
  
 160 170 180 190 200  
 CCTCTGCCTC TGCCATCATG GGCAACCCCA AAGTCAAGGC ACATGGCAAG  
 GGAGACGGAG ACGGTAGTAC CCGTTGGGGT TTCAGTTCCG TGTACCGTTC  
  
 210 220 230 240 250  
 AAGGTGCTGA CTTCTTGGG AGATGCCATA AAGCACCTGG ATGATCTCAA  
 TTCCACGACT GAAGGAACCC TCTACGGTAT TTCGTGGACC TACTAGAGTT  
 Pvu II  
 260 270 280 290 300  
 GGGCACCTTT GCCCAGCTGA GTGAACTGCA CTGTGACAAG CTGCATGTGG  
 CCCGTGGAAG CCGGTCGACT CACTTGACGT GACACTGTTC GACGTACACC  
  
 Bam HI 310 320 330 340 350  
ATCCTGAGAA CTTCAAGCTC CTGGGAAATG TGCTGGTGAC CGTTTTGGCA  
 TAGGACTCTT GAAGTTCGAG GACCCTTTAC ACGACCACTG GCAAAACCGT  
 Eco RI  
 360 370 380 390 400  
 ATCCATTTCG GCAAAGAATT CACCCCTGAG GTGCAGGCTT CCTGGCAGAA  
 TAGGTAAAGC CGTTTCTTAA GTGGGGACTC CACGTCCGAA GGACCGTCTT  
 Bal I  
 410 Pst I 420 430 440 450  
 GATGGTGA CTGCAGTGGCCA GTGCCCTGTC CTCCAGATAC CACTGAGCCCT  
 CTACCACTGA CGTCACCGGT CACGGGACAG GAGGTCTATG GTGACTCGGA  
  
 460 470 480 490 500  
 CTTGCCCATG ATTCAGAGCT TTCAAGGATA GGCTTTATTG TGCAAGCAAT  
 GAACGGGTAC TAAGTCTCGA AAGTTCCTAT CCGAAATAAG ACGTTCGTTA  
  
 510 520 530  
 ACAAATAATA AATCTATTCT GCTGAGAGAG TCAC 3'  
 TGTTTATTAT TTAGATAAGA CCACTCTCTC AGTG 5'

FIG. 18

GAM-5-S (5' - iniciador da extremidade)

SaII

Met

5' CAAGTTGGTCGACAAAAAATATGGGTCAATTCACAGAGGAGGACAGGCTACTATCAAGCCT  
GTGG 3'

GAM-3-H (3' - iniciador da extremidade)

HindIII

5' GCCCGATAGCTAAGCTTGGCTCAGTGGTATCTGGAGGACAGGCACTGGCCACTGC3'  
Paragem

FIG. 19

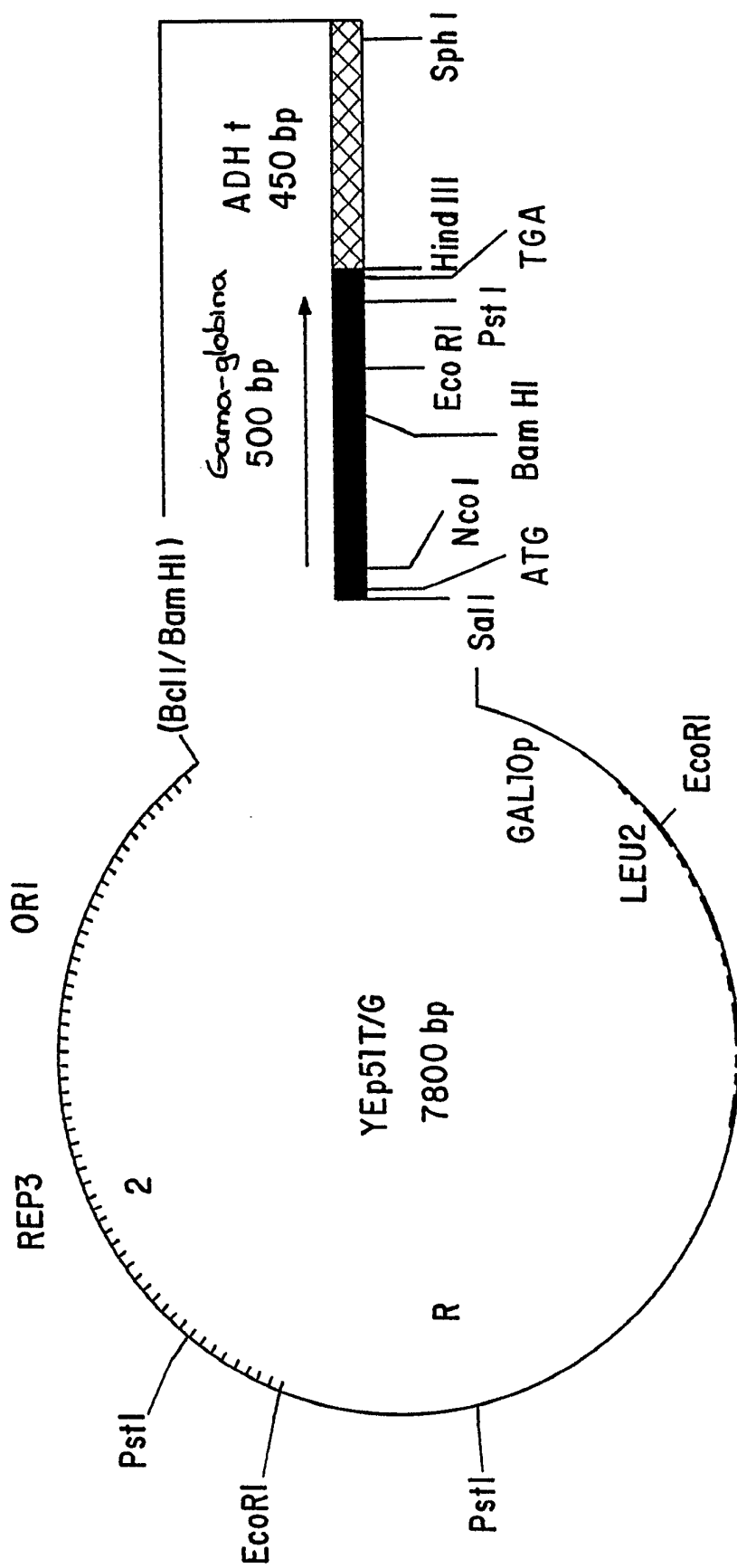


FIG. 20

5' iniciador: 5TG-Apal

ApalI

5'-TGA TCG ATG gtg cac TTC ACA GAG GAG GAC AAG GCT ACT ATC ACA-3'

3' iniciador: ADHSBS-3''-C GTA CTC CAG CGA GAA TAA GTG GTG TGG AGA  
TGG CCG TAC G

cgt acg cct agg ctc gag TT TAA-5'  
SphI BamHI SacI

FIG. 21

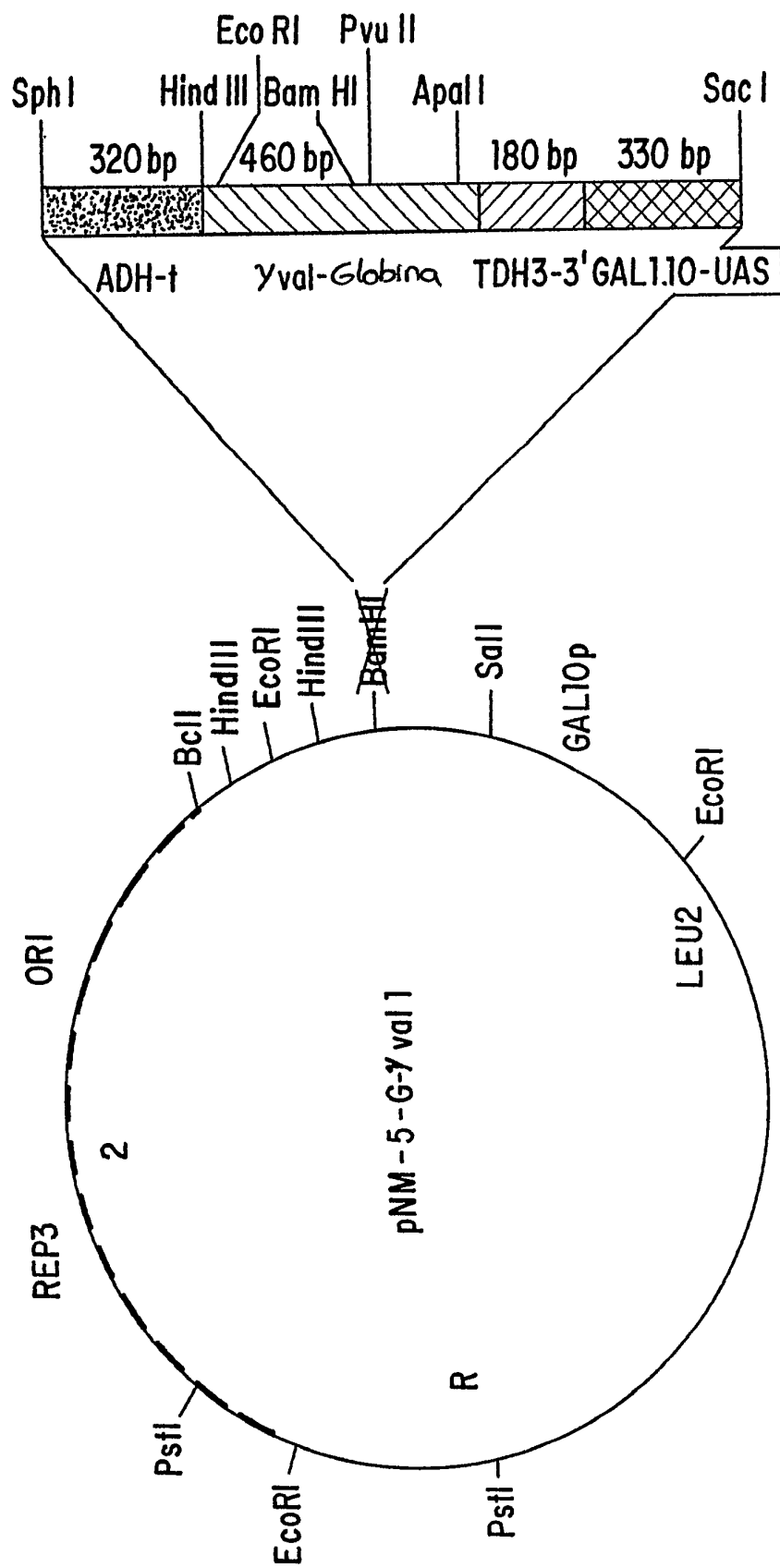


FIG. 22

1. Iniciador 51-A-1:  

SalI  
 5' AAGGTCGACAATATAAA

Met  
**ATGGTGCTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGC3'**
  
2. Iniciador 519-A-3:  

BamHI  
 5' GGGAAATCCCGGGATCC

TTAACGGTATTGGAGGTCAGCACGGTGCTCACAGAAAG  
 CCAGGAACTTGTCAGCAGGGAGGCG 3'

FIG. 23



1. Iniciador G10T-5B:

BamHI

5' AGCTAGCTGGATCCGGTAGATACATTGATGCTATCAATCAAGAGAACTGG 3'

2. Iniciador G10T3ESS:

EcoRI SalI SphI

5' AGCTAGCTGAATTCCGACGCGATGCCGTAACGAAATAAATCCGCGGCTCGTGC 3'

FIG. 24

5' Iniciador

5'--GCTAgtcgacCCcAGAAATAAGGC--3'

Sali

3' Iniciador

-----TDH3-3' Seqüências -----  
 3'--TTGTGGTTCTTGAATCAAAGCTTATTGTGTGTTATTATTGTTTT  
 -----seqüências -----alfa-globina-----  
 ACCACGACAGAGGCGGTGTTCTGTGCAGTtccggacCCCG--5'

StuI

GTCCCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAG\*GCCTGG

ValLeuSerProAlaAspLysThraS<sup>n</sup>Vallys\*AlaTrp

\* alfa-12 alanina está deletada

FIG. 25

5' Iniciador

5' --ATCGCgtcgacATGGTGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCTG--3'  
Sali

3' Iniciador

3' --GTGAGCACCGTGCTGACCTCCAAATACCGTTAAcctagggtcgaaGCGT--5'  
BamHI HindIII

FIG. 26

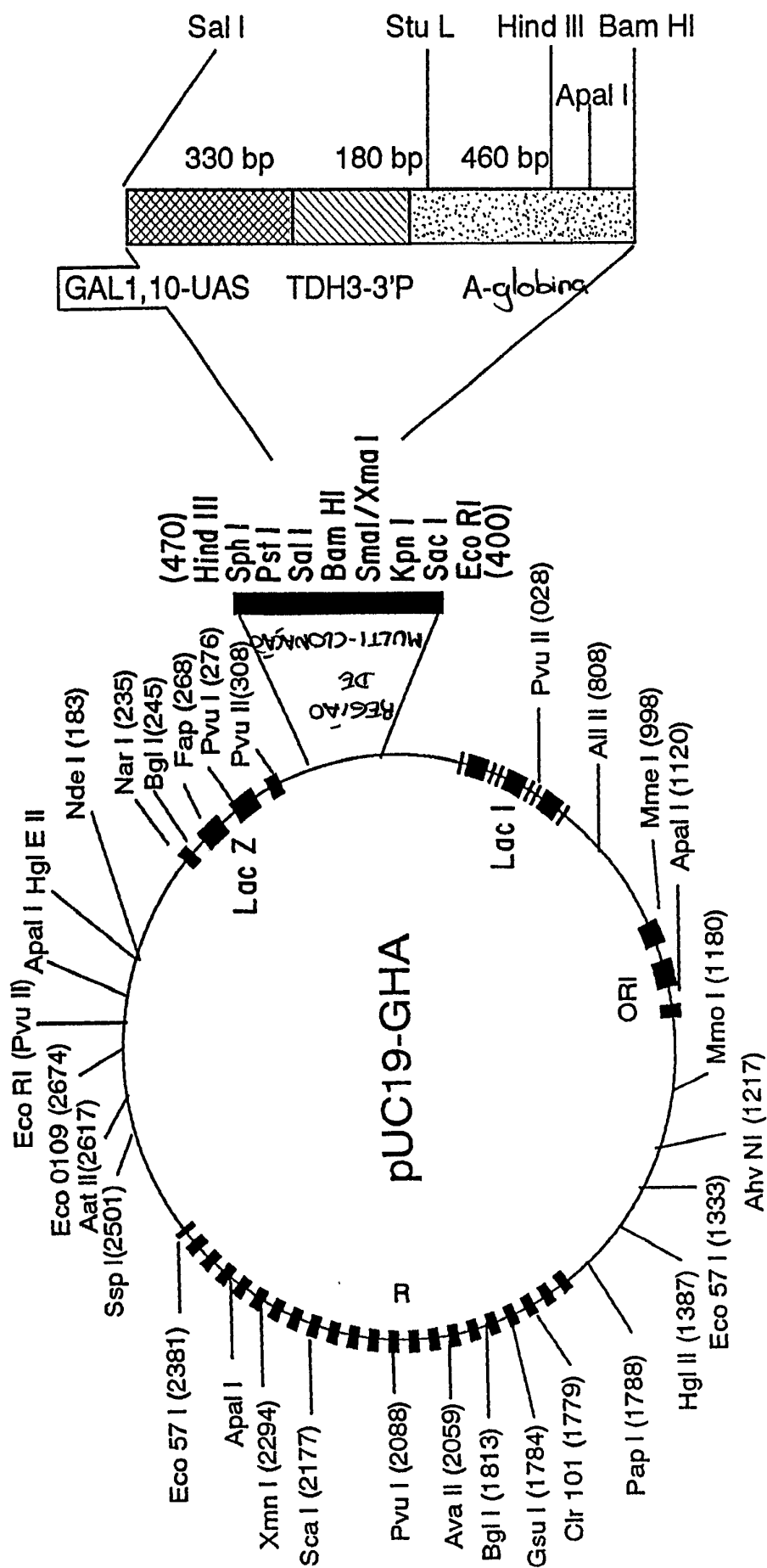


FIG. 27

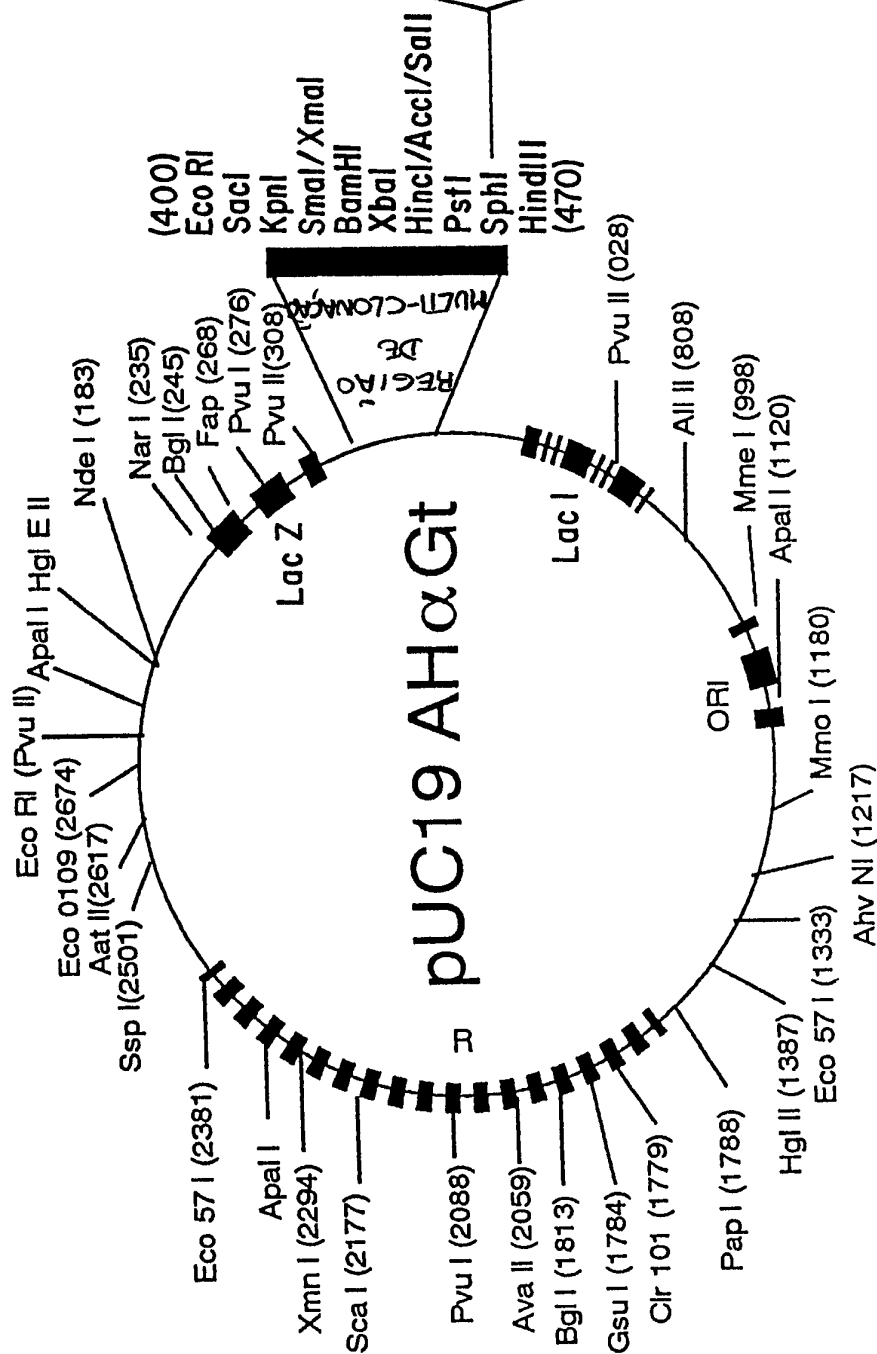
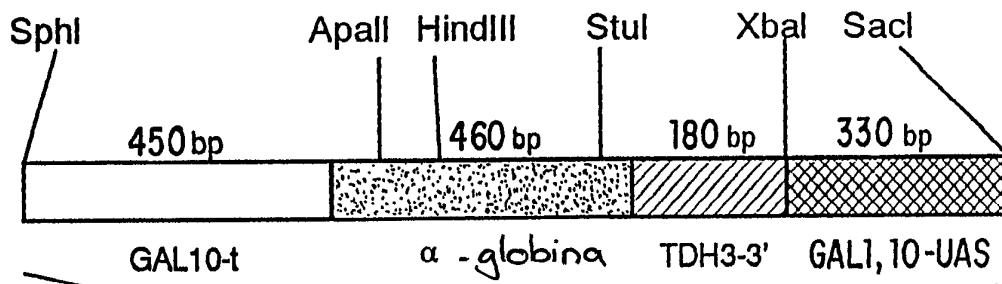


FIG. 28

5'Iniciador-5TDH3-3X:

XbaI BglII SalI

5'GACGAGAtctagaagatctgtcgacATGGTGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACG 3'

3'Iniciador-G10T3ESS:

EcoRI SalI SphI

5'-AGCTAGCTgaattcgtcgacgcatgcGTAACGAAATAAATCCGGGCTCGTGC-3'

FIG. 29

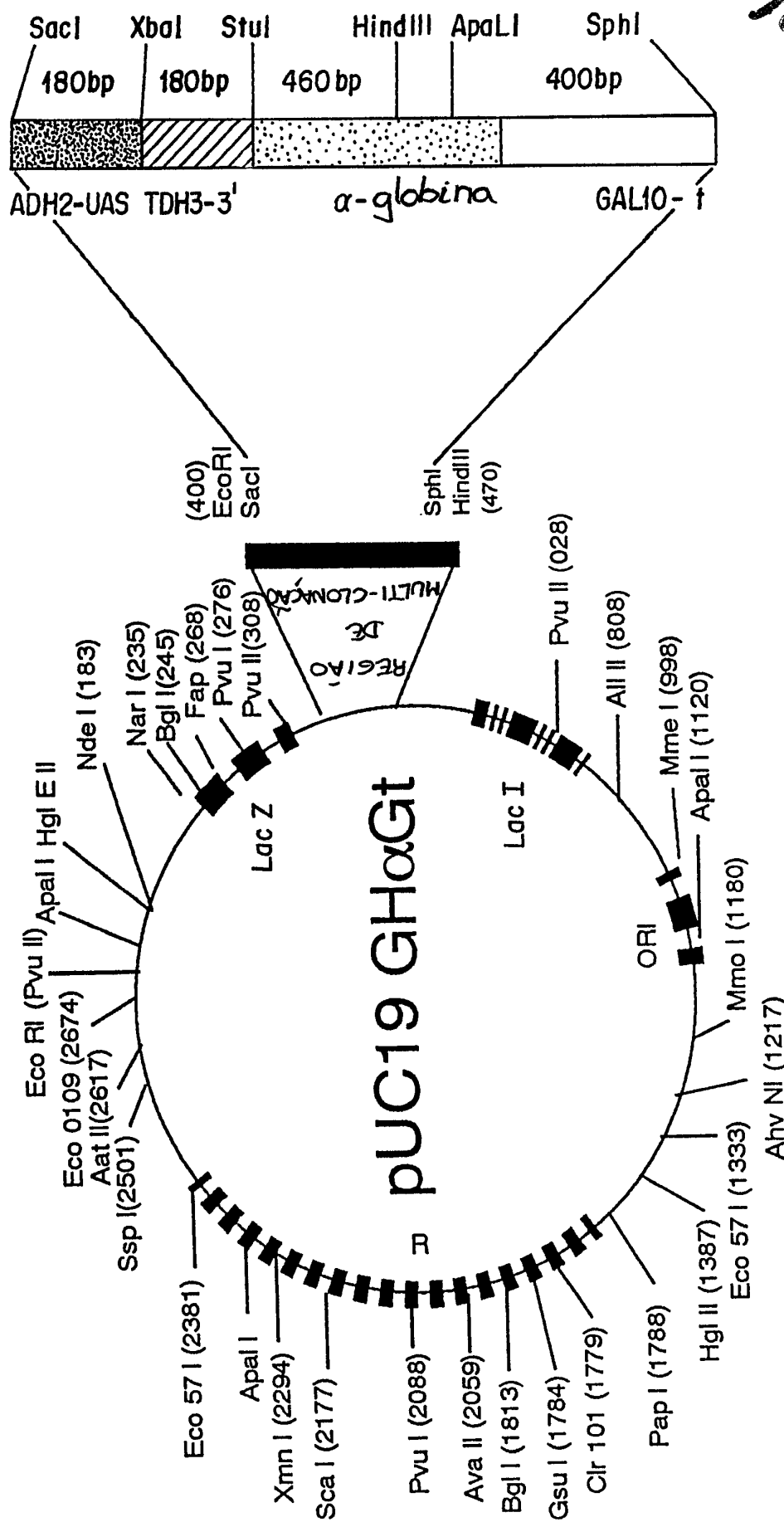


FIG. 30

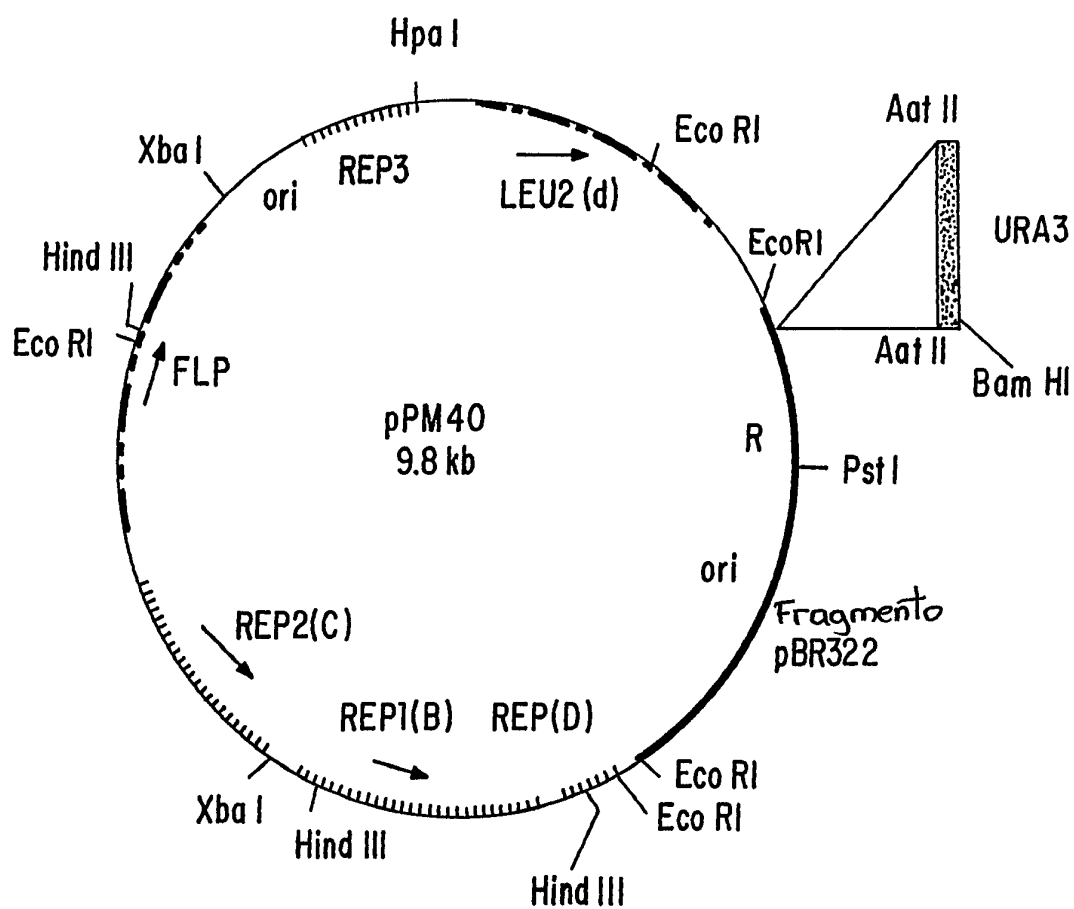


FIG. 31

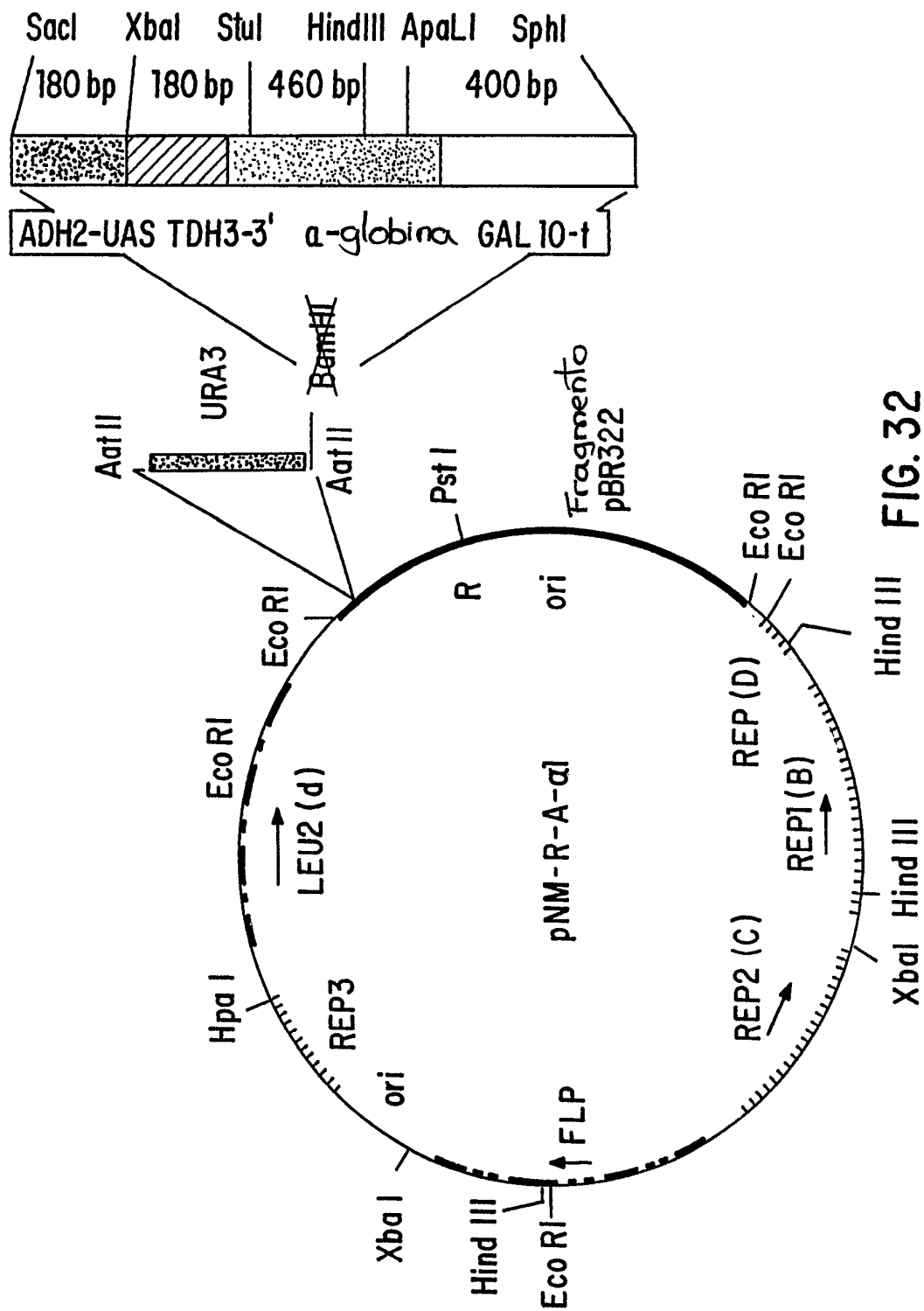


FIG. 32

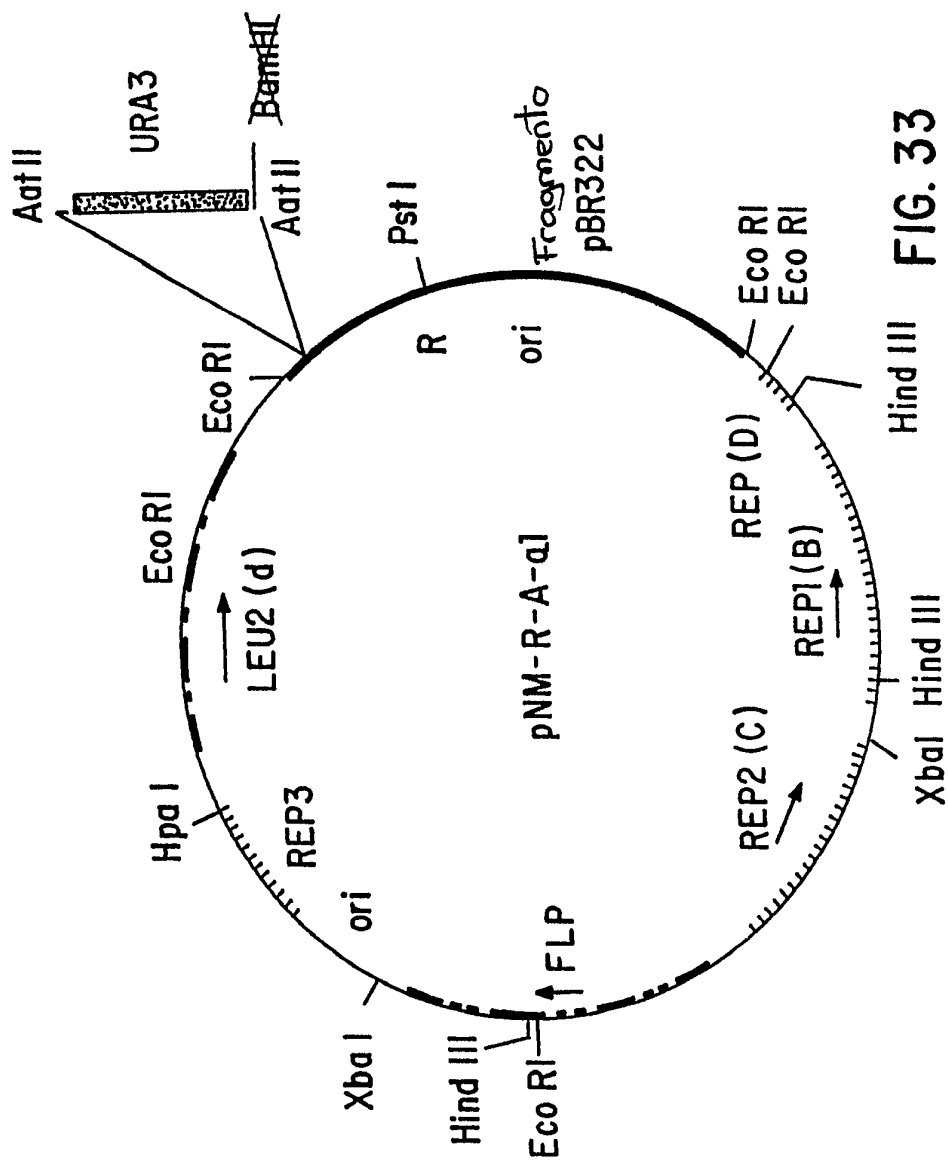
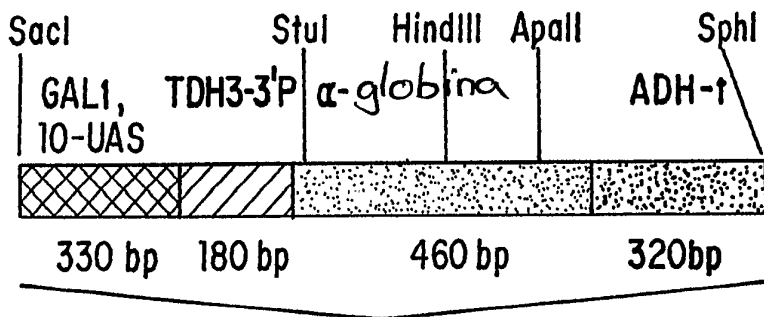


FIG. 33

CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO DE CASSETE DUPLA pBMVX1-G- $\alpha$  e pBMVX2-G- $\alpha$

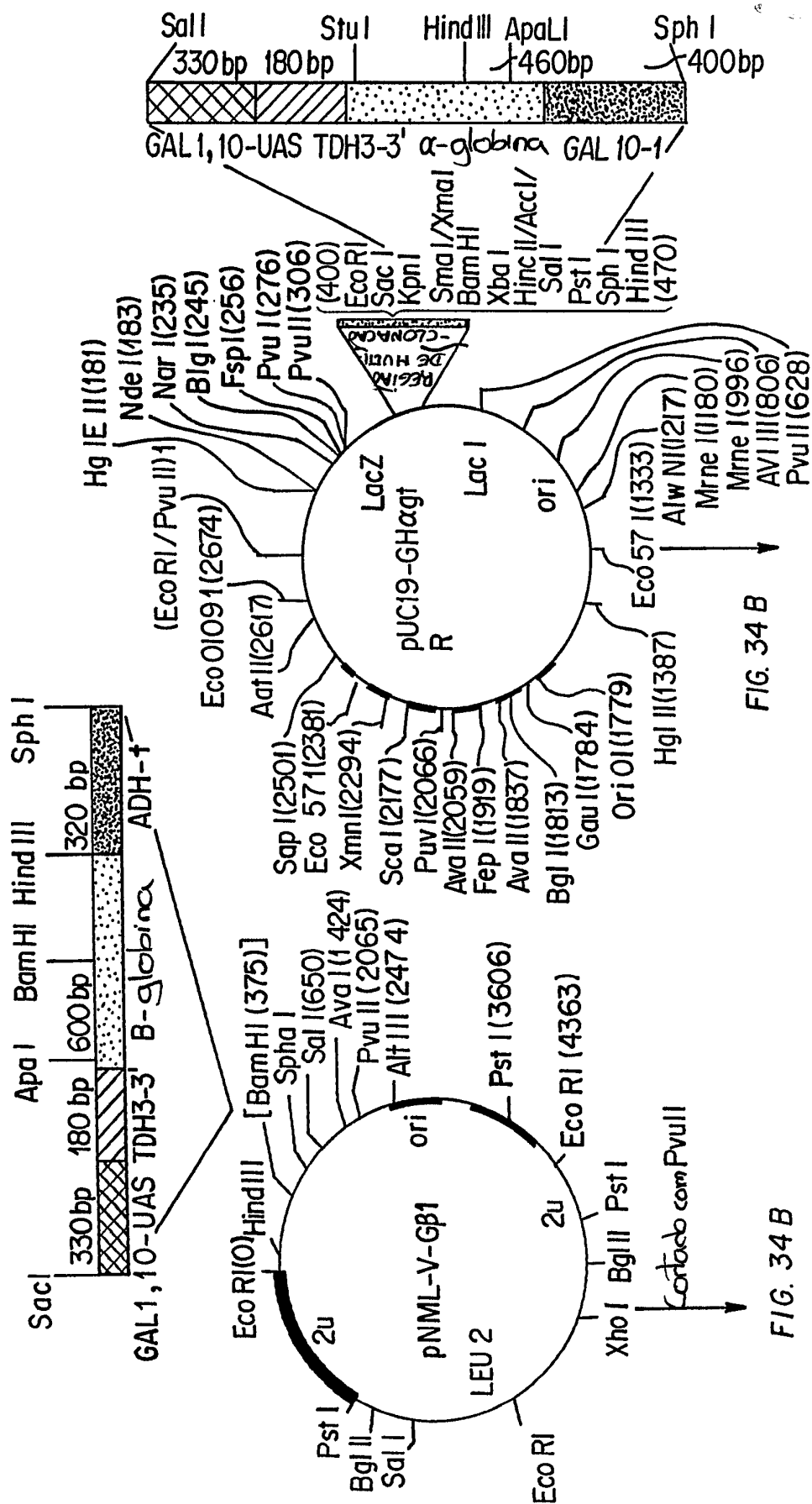


FIG. 34A

FIG. 34B

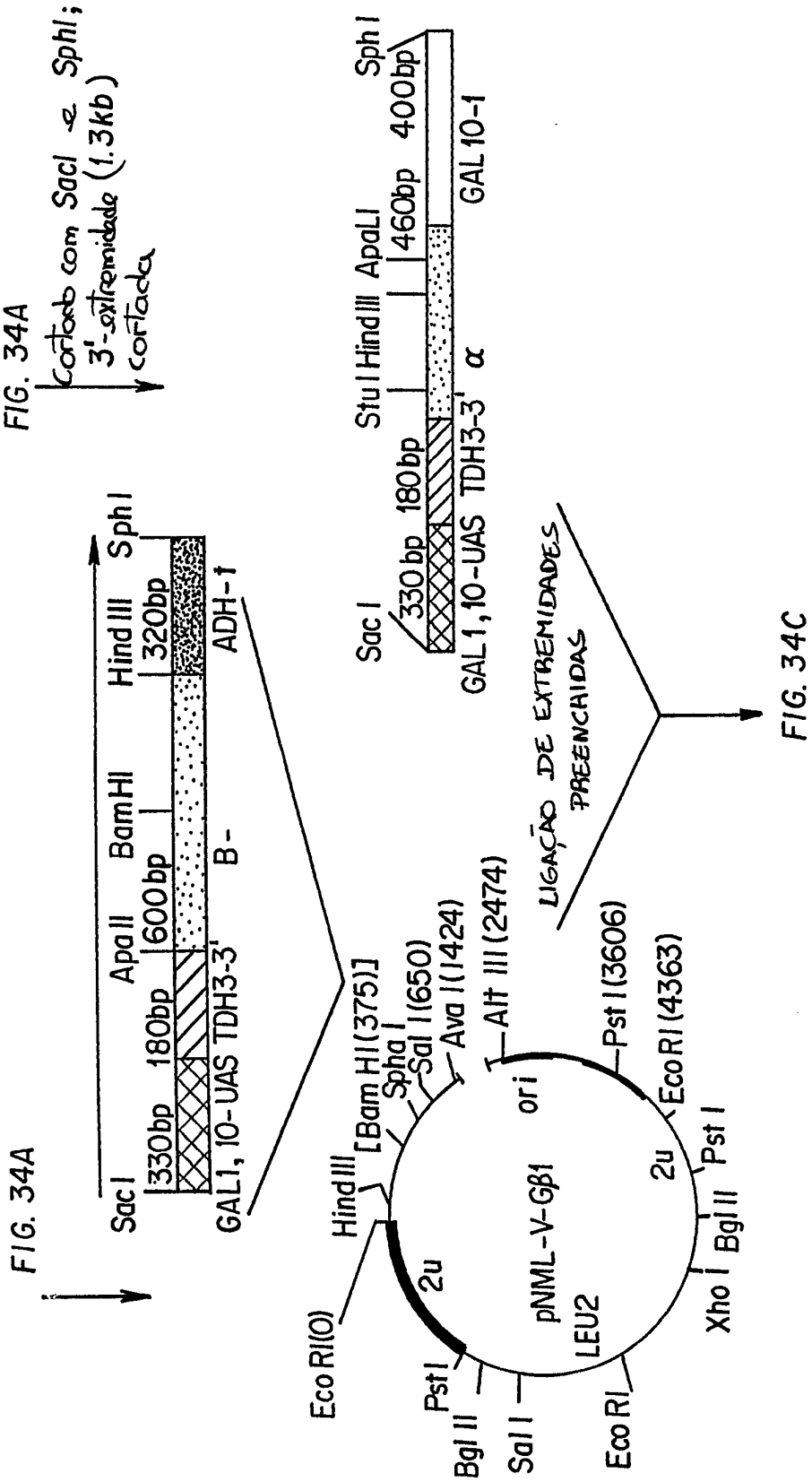
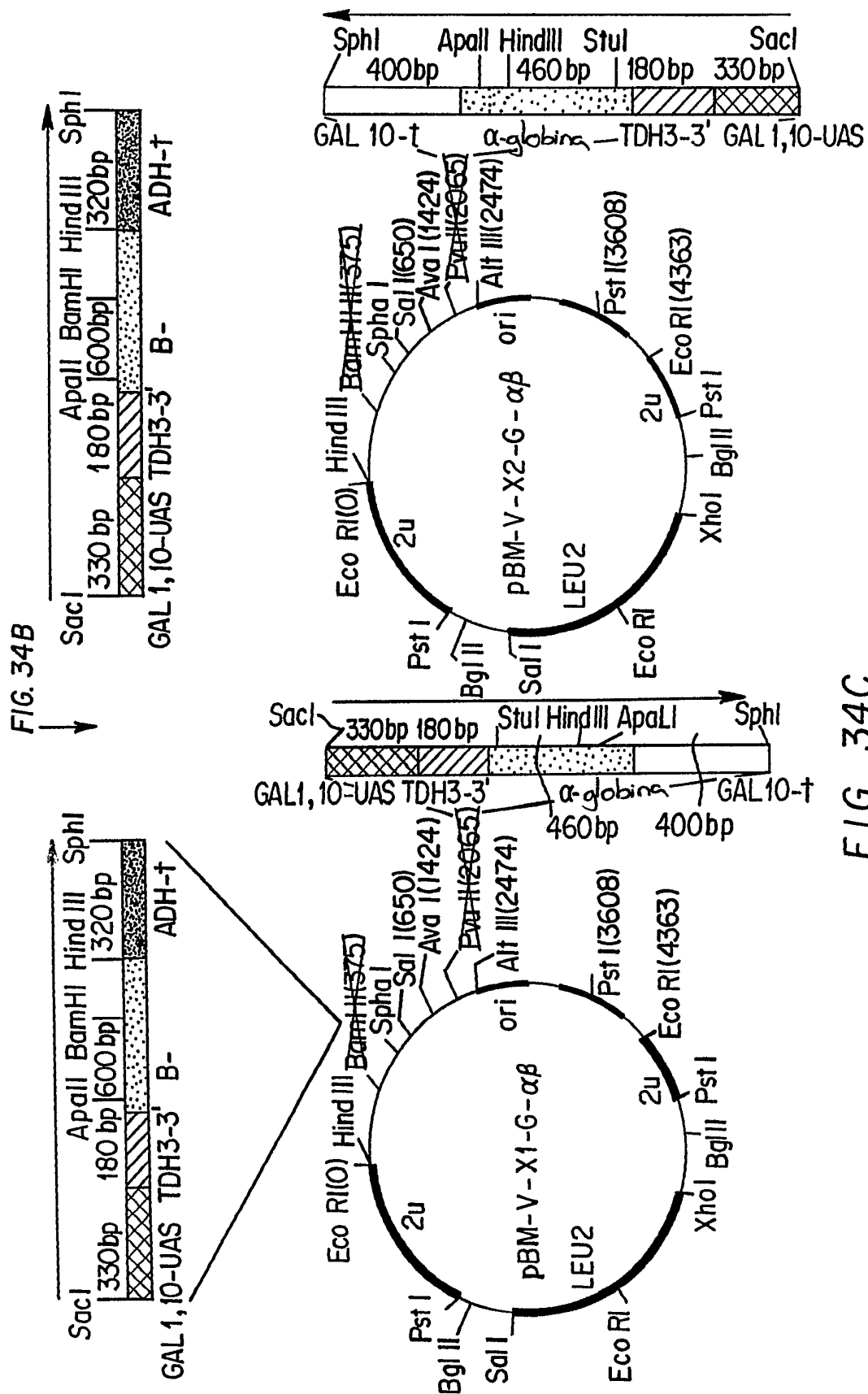


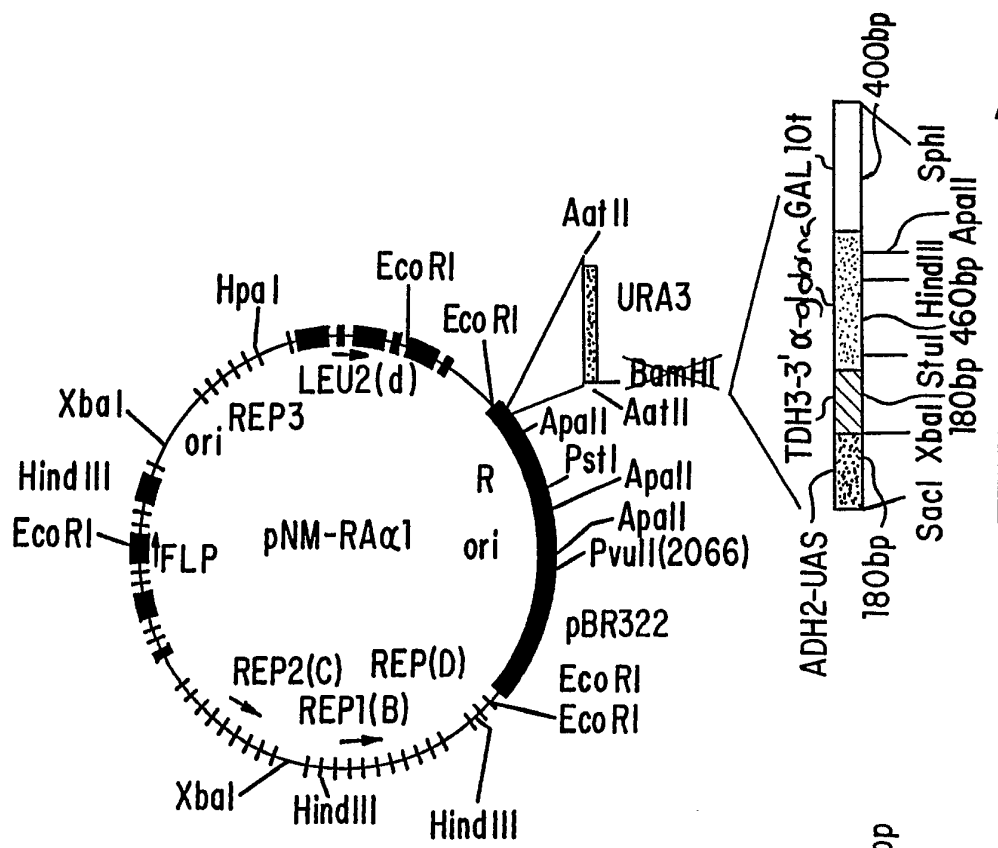
FIG. 34B



5' Initiator  
 5'-TAT AT gga tcc aag ctt TGGA CTT CTT CGC CAG AGA GG-3'  
                     BamHI HindIII

3' Initiator  
 5'-AAT TT gag ctc gga tcc gca tgc G CAT GCC GGT AGA GGT GTG GTC  
                     SacI BamHI SphI  
 AAT AAG AGC GAC CTC ATG C-3'

FIG. 35



Cortado  
com PvuII

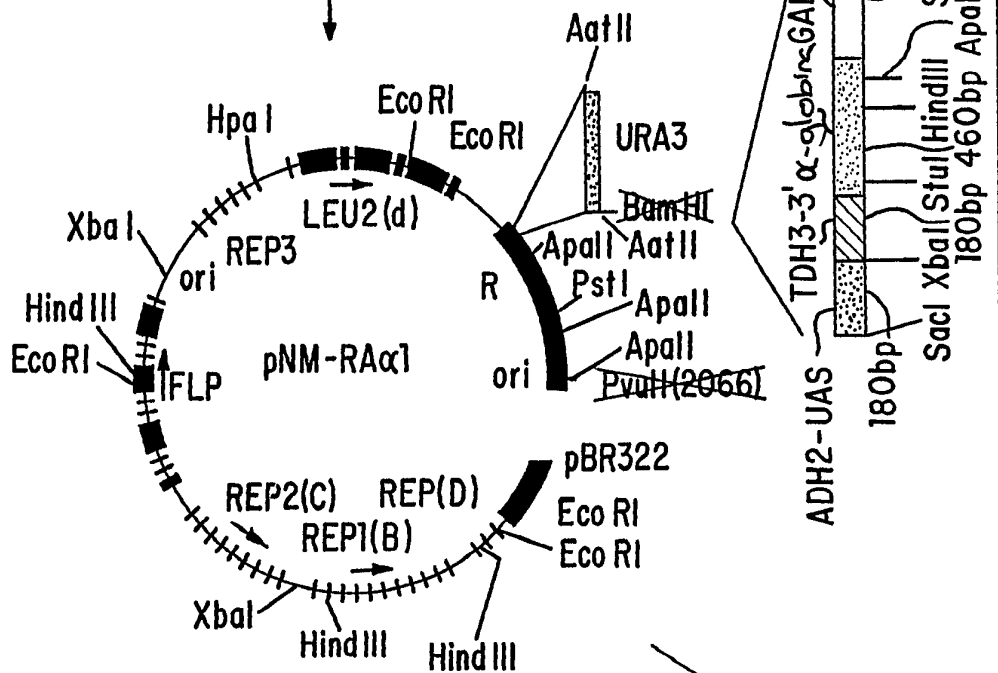


FIG. 36A

FIG. 36C

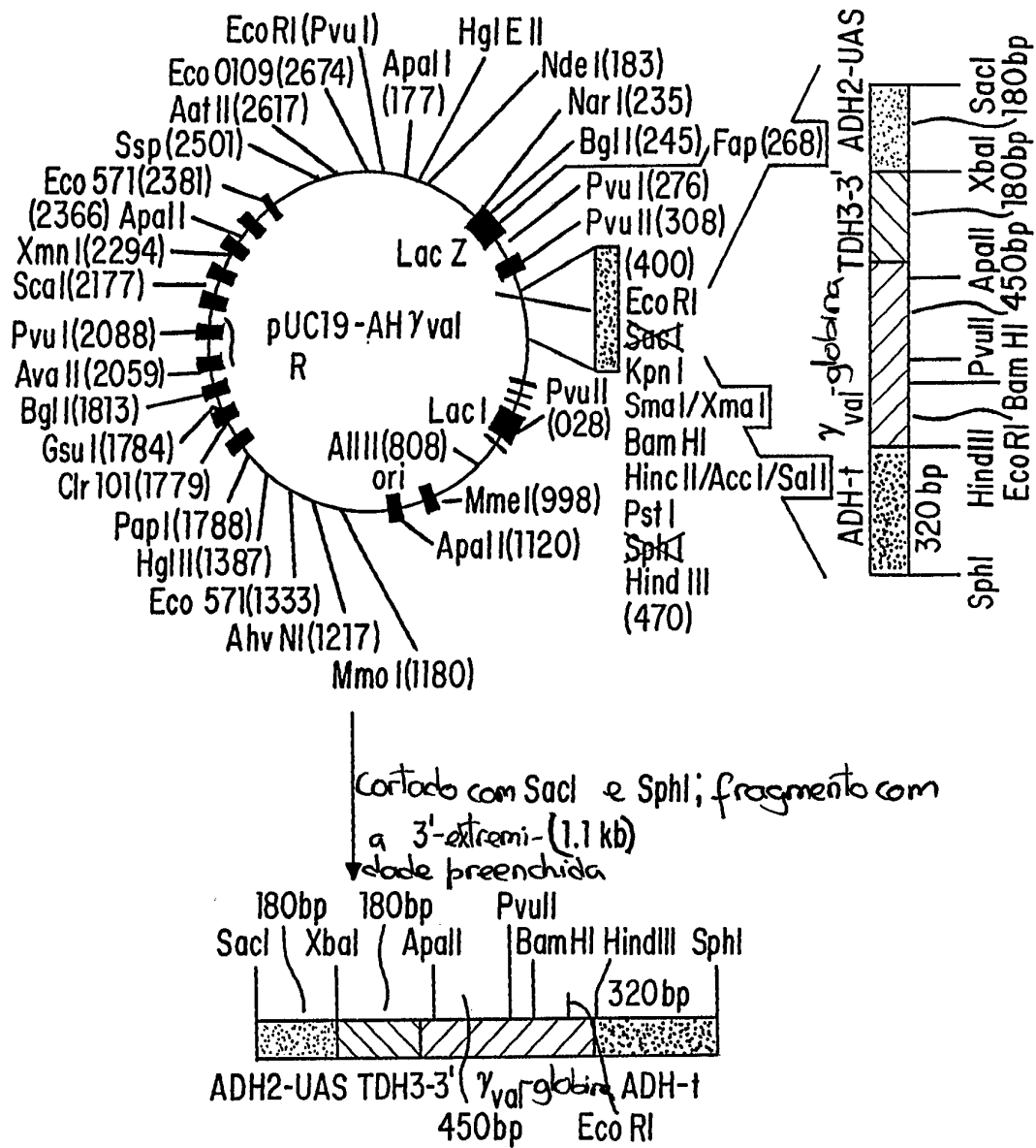


FIG. 36B

FIG. 36C

FIG. 36A LIGAÇÃO DE EXTREMIDADES  
PREENCHIDAS



5'Iniciador de ADH2-UAS:

5'-CGATCGgagctcATTAAcGGCTTTCGCTCATAA-3'  
SacI

3'Iniciador de ADH2-UAS:

3'-GTGTCCCTCTCGTATCTTACCCCAAagatctGCGCA-5'  
XbaI

FIG. 37

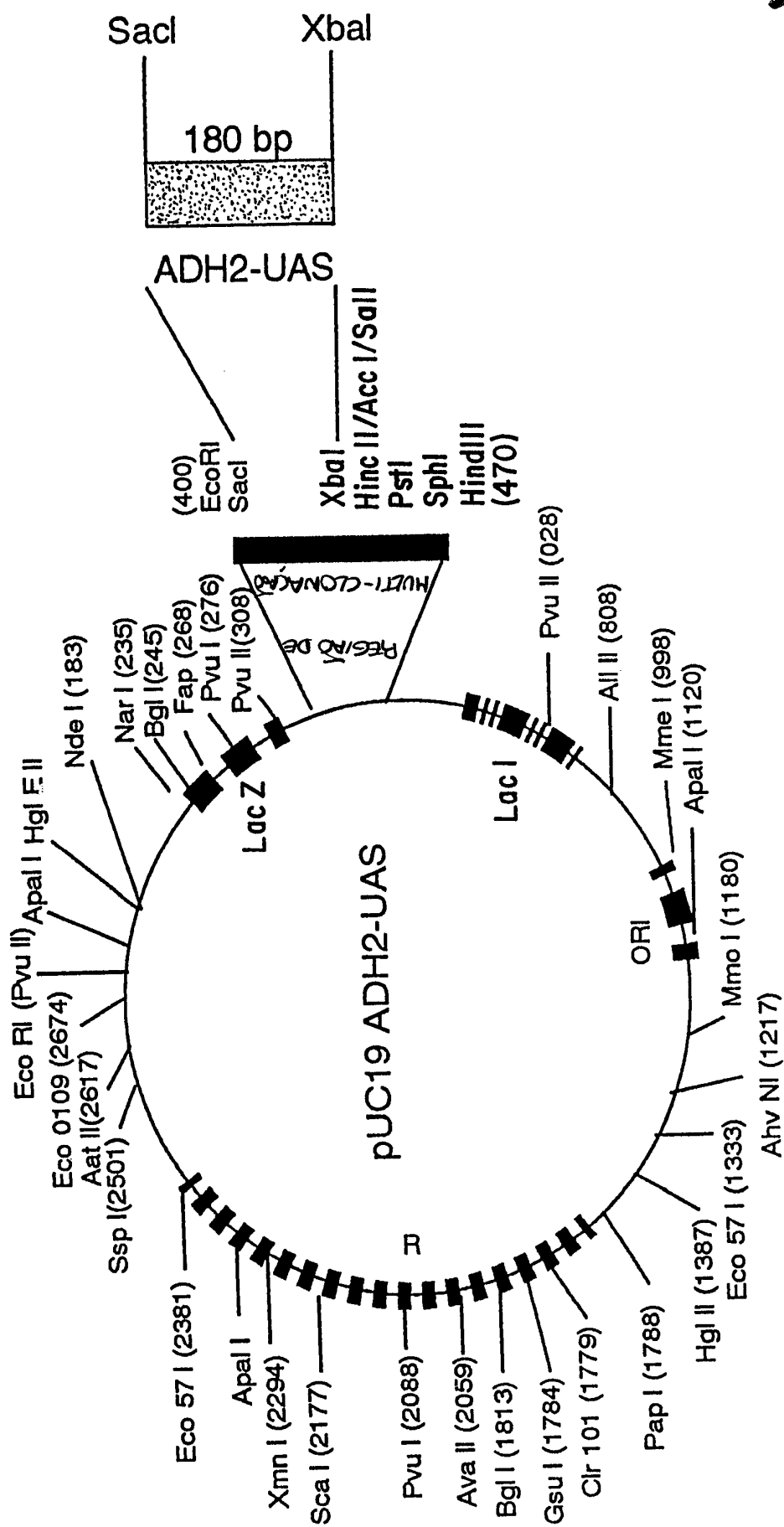


FIG. 38

5' Iniciador

XbaI  
5'-AGC GCC tct aga AAG GTT GAA ACC AGT TCC CTC-3'

3' Iniciador-ADH-t-SBS:

SacI    BamHI    SphI  
5'-AAT TT gag ctc gga tcc gca tgc GCA TGC CGG TAG AGG TGT GGT CAA  
TAA GAG CGA CCT CAT GC-3'

FIG. 39



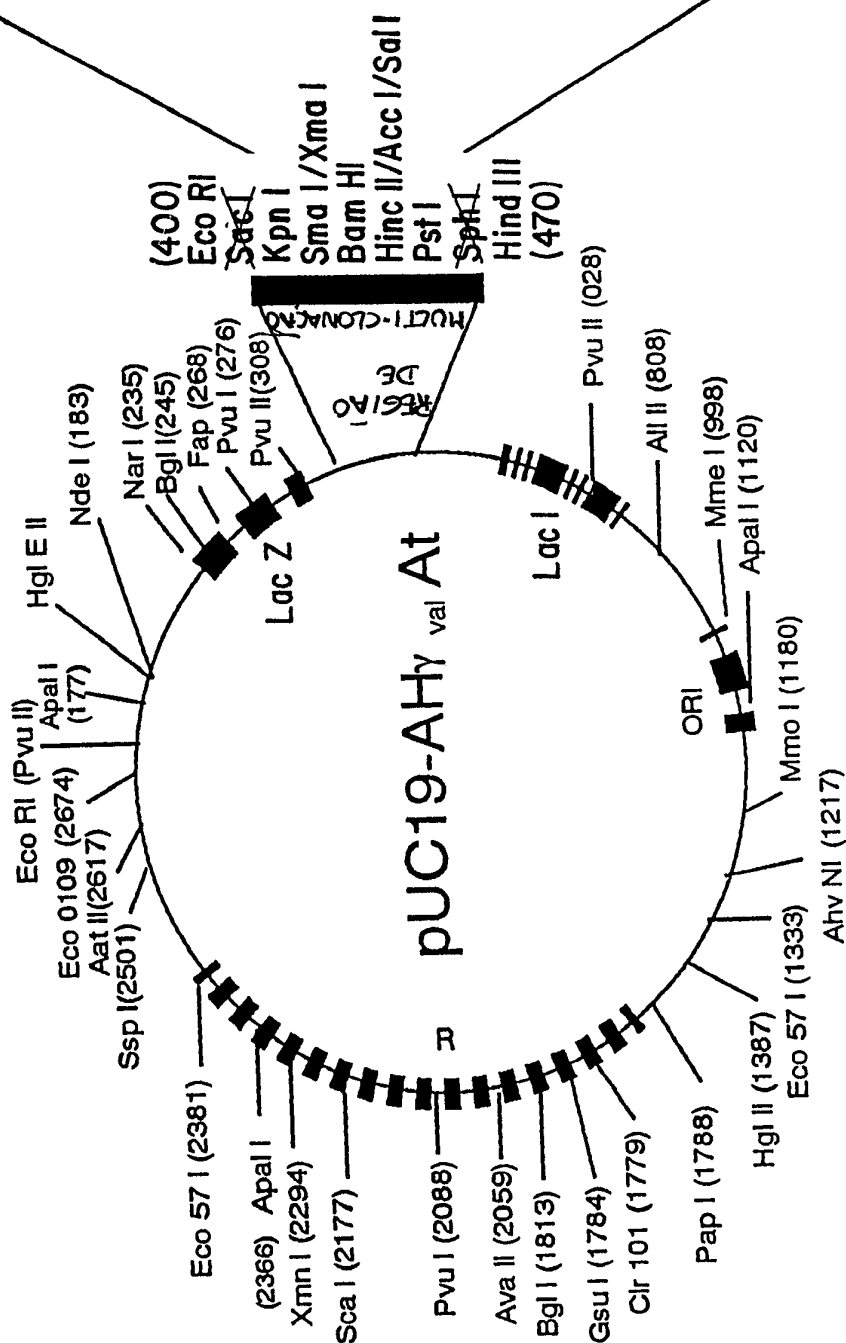
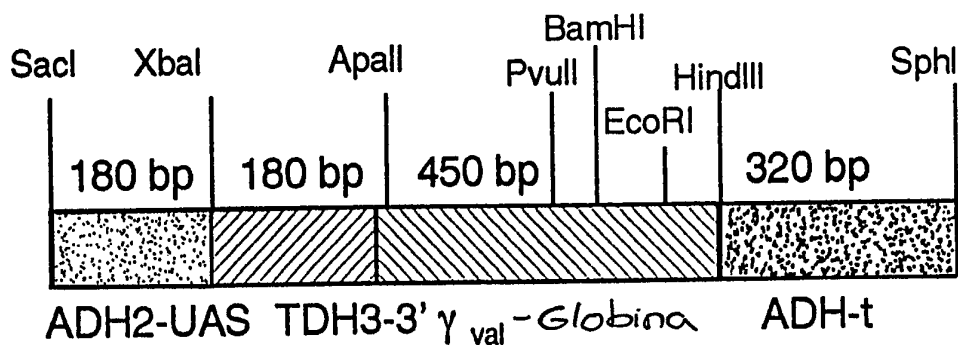


FIG. 40

Mu-145Cy 5' GCC CTG GCC CAC AAG **TGT** CAC TAA GCT CGC 3'  
(Tyr->Cys)

Mu-66Th 5' G AAG GCT CAT GGC AAG **ACT** GTG CTC GGT GCC TTT AG  
3' (Lys->Thr)

Mu-9Cy 5' CT CCT GAG GAG AAG **TGT** GCC GTT ACT  
(Ser->Thr)

FIG. 41

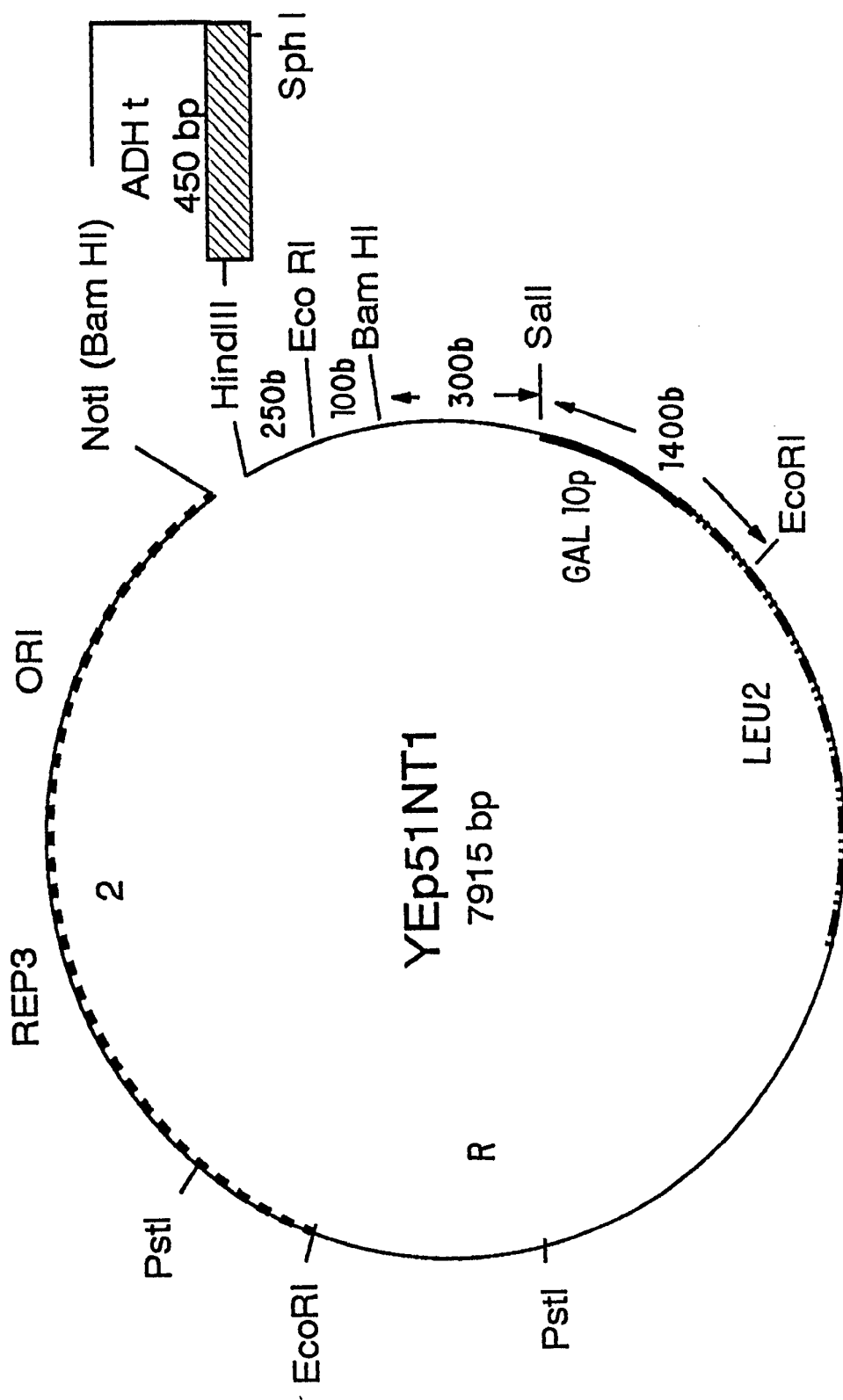


FIG. 42

a: BN-5-Sal (5' - Iniciador da extremidade)  
5' CAAGTTGGGTCGACAAAAAATATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAAGTCTGCC 3'  
SalI

b: B-B3-Ta1 (3' - Iniciador da extremidade)  
5' GAAGTCTCAGGATCCACGTGCAGCTTGTACAGTGCAGTCACTCAGTGTGGCAA  
BamHI  
\*  
AGGTGCACTTGAG 3'

FIG. 43

- a: B-G127-5 (5'-Iniciador da extremidade)  
5' CATCACTTTGGCAAAGAAATTCACCCACCAAGTGGAGGCTGCCCTATCAGAAAGTG 3'  
EcoRI \*
- b: Beta-3-H (3'-Iniciador da extremidade)  
5' ATCGCGAAGCTTTAGTGATACTTGTGGGCCA 3'  
HindIII

FIG. 44

a: A-Tit-5 (5'-Iniciador da extremidade)

5' GACCTGCACGGCACAAAGCTTCGGGTGAACCCGGTCA 3' <sup>HindIII \*</sup>

b: G10T3H (3'-Iniciador da extremidade)

5' AGCTAGCTAAGCTTGCTATATTCTTGTGCTACCGTCCATATCTT 3' <sup>HindIII</sup>

FIG. 45

a: A104S-5 (5'-Iniciador da extremidade)  
HindIII  
5' CTGCACGCGCACAAAGCTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTCC  
CTGCTGGTG 3' \*

b: G10T3H (3'-Iniciador da extremidade)  
HindIII  
5' AGCTAGCTAAGCTTGCTATATTCTTGTGCTACCGTCCATATCTT 3'

FIG. 46

a: GAM-5-S (5'-Iniciador da extremidade)

SalI

5' CAAAGTTGGGTCGACAAAAAATATGGGTCAATTCACAGAGGAGGACAAAG

b: G66T-3 (3'-Iniciador da extremidade)

XcmI

5' CCCTTGAGATCATCCAGGTGCTTTATGGCATCTCCCAAGGAAGTCAGCACCGTCTTGCC  
3' \*

FIG. 47

a: G-5-9CY (5' - Iniciador da extremidade)

5' CAAGTTGGTCCGACAAAAAATATGGGTCA<sup>\*\*</sup>TTTCACAGAGGAGGACAAAGTG<sup>\*\*</sup>TACTAT 3'

b: G66T-3 (3' - Iniciador da extremidade)

5' CCCTTGAGATCATCCAGGTGCTTTATGGCATCTCCCAAGGAAGTCAGCACCGTCTTGCC<sup>\*</sup>  
3'

FIG. 48

a: Z-5-SAL (5'-Iniciador da extremidade)

SalI

5' CAAGTTGGTCGACAAAAAATATGTCTCTGACCAAGACTGAGAGGACCATCATTTGTG  
3'

b: Z-A95-3 (3'-Iniciador da extremidade)

BstEII

5' GCGCGGGCCAGGGTGACCAGCAGGCAGTGGGACAGGAGCTTGAAGTTGACCGGGTTCAC  
GCGCA 3' \*

FIG. 49

42

a: Z-BST-5 (5'-Iniciador da extremidade)

BstEII

5' CACTGCCCTGCTGGTCA~~CCCTGGCCGCGGCTTCCCCGCCGAC~~ 3'

b: Z-3-H (3'-Iniciador da extremidade)

HindIII

5' TTTACCAGACGATTTCGAAATCGCTTAGCGGTACTTCTCGGTCAGGACAGAGGATAC 3'

FIG. 50

a: B44C-5 (5'-Iniciador da extremidade)

Acc I

5' AGGCTGCTGGTGGTCTACCCCTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTGTTTGGGGATCTGTC

3'

b: Beta-3-H (3'-Iniciador da extremidade)

Hind III

5' ATCGCGAAGCTTTTAGTGATAGTGGCCA 3'

\*\*

FIG. 51