INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 851932 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/64 A C12N015/68 B
C12N001/21 B C12P021/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1996.09.06

(30) *Prioridade:* 1995.09.08 GB 9518395

(43) *Data de publicação do pedido:*
1998.07.08

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.02.14

(73) *Titular(es):*
COBRA THERAPEUTICS LIMITED
UNIVERSITY OF KEELE, THE SCIENCE PARK KEELE,
STAFFORDSHIRE ST5 5SP GB

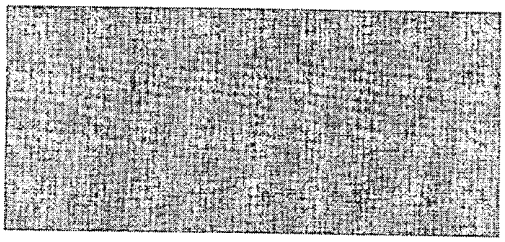
(72) *Inventor(es):*
DAVID JOHN SHERRATT GB
STEVEN GERAINT WILLIAMS GB
JULIAN ALEXIS JOHN HANAK GB

(74) *Mandatário(s):*
PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ESTABILIZAÇÃO DE PLASMÍDEOS

(57) *Resumo:*

ESTABILIZAÇÃO DE PLASMÍDEOS



851932

DESCRIÇÃO

"ESTABILIZAÇÃO DE PLASMÍDEOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se de um modo geral à manutenção estável de um plasmídeo, e em particular a um plasmídeo contendo um gene útil em terapia génica.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A manutenção estável de um plasmídeo, particularmente num número de cópias elevado, é importante para a preparação de ADN transportando um gene terapêutico para utilização em terapia génica. Contudo, o ADN extracromossómico transportado em células hospedeiras é inerentemente instável em cultura de células porque as células cultivadas que contêm plasmídeos possuem normalmente uma carga metabólica aumentada em comparação com células segregantes livres de plasmídeo. Em esforços para manter a estabilidade dos plasmídeos e diminuir a carga metabólica têm sido utilizados por rotina plasmídeos construídos para conterem marcadores de selecção dominantes. Durante o aumento de escala da fermentação de estirpes hospedeiras de bactérias ou leveduras a presença do agente de selecção impede a perda do plasmídeo e o sobrecrescimento de células não sobrecarregadas pelo esforço da replicação e manutenção do ADN plasmídico.

Os genes de resistência a antibióticos, por exemplo codificando resistência a antibióticos tais como ampicilina, canamicina ou tetraciclina, são os marcadores de selecção mais comuns em clonagem na biologia molecular e em processos de fermentação para a produção de proteínas recombinantes ou ADN plasmídico. Para fermentação em contínuo na presença de um antibiótico, a pressão selectiva perde-se porque o antibiótico perde actividade ao longo do tempo devido à diluição da cultura ou degradação pela célula hospedeira. Por isso, alguns dos

métodos mais bem sucedidos para a manutenção de plasmídeos não utilizam selecção por antibiótico mas baseiam-se num hospedeiro mutante que é incapaz de sintetizar um aminoácido e na inserção do gene que proporciona esta síntese no plasmídeo. Outras soluções que impedem a sobreposição da cultura por segregantes sem plasmídeos envolvem colocar um gene que codifica para um produto tóxico no cromossoma e depois incluir um sistema de repressão correspondente no plasmídeo. As células livres de plasmídeo são eficazmente mortas durante a segregação.

Mesmo com pressão selectiva, contudo, as células sem plasmídeo podem continuar a crescer devido a fuga do produto complementar do gene selectivo de células que comportam plasmídeo. Adicionalmente, a utilização de genes para resistência a antibióticos ou outros marcadores de selecção dominantes em vectores pretendidos para terapia génica levantou problemas potenciais relacionados com a expressão desses genes na célula de mamífero alvo ou no organismo mamífero hospedeiro. A expressão desses genes na célula de mamífero alvo pode levar à sua destruição e/ou a uma resposta antigénica ao produto do gene no mamífero. Também existem preocupações em relação à contaminação do produto final com o antibiótico utilizado para selecção de plasmídeo em cultura, com a indução potencial de uma resposta imune severa ao antibiótico, p. ex., choque anafiláctico. A utilização amplamente divulgada de genes bacterianos para resistência a antibióticos também resultará em última análise na sua transferência para a população bacteriana como um todo. Há por isso uma necessidade para um método de manutenção de plasmídeo que não necessite da presença de genes originários do plasmídeo ou selecção de antibiótico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção baseia-se na descoberta de um sistema de manutenção de plasmídeo que não necessita da utilização de um

marcador de selecção dominante originário do plasmídeo, mas em alternativa utiliza um sistema de titulação do repressor.

A invenção compreende uma célula hospedeira transformada num meio de cultura, contendo a célula hospedeira

um plasmídeo compreendendo um operador susceptível de se ligar a um repressor,

um primeiro gene presente no cromossoma codificando o referido repressor, e

um segundo gene no cromossoma que está funcionalmente associado ao referido operador e essencial para o crescimento celular no meio,

em que o referido plasmídeo está presente na referida célula em números suficientes para titular o referido repressor de modo a que o gene essencial seja expresso, permitindo assim o crescimento celular, desde que o referido segundo gene cromossómico não seja um gene de resistência a antibiótico.

A invenção também compreende uma célula hospedeira transformada num meio de cultura, contendo a célula hospedeira

um plasmídeo compreendendo um operador susceptível de se ligar a repressor,

um primeiro gene presente no cromossoma que codifica o referido repressor, e

um segundo gene presente no cromossoma que está funcionalmente associado ao referido operador e é essencial para o crescimento celular no meio,

em que o referido plasmídeo está presente na referida célula em números suficientes para titular o referido repressor, de modo a que o referido gene essencial seja expresso, permitindo assim o crescimento celular, e em que o referido segundo gene cromossómico é necessário para a biossíntese de um metabolito celular, para o metabolismo do carbono, biossíntese ou regulação de macromoléculas ou para a síntese de ADN e/ou ARN e funções de replicação.

A invenção também compreende uma célula hospedeira transformada num meio de cultura, contendo a célula hospedeira

um plasmídeo compreendendo um operador susceptível de se ligar a um repressor,

um primeiro gene presente no cromossoma que codifica para o referido repressor, e

um segundo gene presente no cromossoma que está funcionalmente associado ao referido operador e é essencial para o crescimento celular no meio,

em que o referido plasmídeo está presente na referida célula em números suficientes para titular o referido repressor de tal modo que o referido gene essencial seja expresso, permitindo assim o crescimento celular, e em que o referido segundo gene cromossómico é um gene da célula hospedeira ou corresponde a um gene da célula hospedeira e é essencial para o crescimento celular.

Como aqui utilizado, "funcionalmente associado" ou "operacionalmente associado", em relação a uma sequência de operador e a um gene associado, significa que o operador está ligado em cis ao gene, de modo a que a expressão do gene é sensível à repressão em função da ligação de um repressor ao operador.

Será entendido por um especialista na técnica que o termo operador é utilizado para definir qualquer sequência de ácido nucleico à qual se liga um repressor para impedir transcrição de um promotor associado. A sequência do operador presente no plasmídeo não necessita ser uma sequência que seja idêntica à sequência do operador no gene cromossómico, na medida em que o operador do plasmídeo apenas necessita de consistir nas sequências mínimas necessárias para ligar o repressor que reprime a transcrição ao gene cromossómico. Deve também ser entendido que as sequências mutadas do operador também são úteis de acordo com a invenção, por exemplo, sequências possuindo um ou mais nucleótidos inseridos, removidos, ou substituídos, que

resultam em afinidade aumentada ou diminuída para o repressor correspondente.

Como aqui utilizado, "crescimento celular" refere-se a números crescentes de células num meio de cultura ao longo do tempo, e também se refere a sobrevivência celular em que o número de células não aumenta ao longo do tempo, mas em que o número de células vivas não diminui ao longo do tempo.

Preferencialmente, o gene repressor codifica um dos repressores lac de *E. coli*, o repressor de λ, o repressor trp de *E. coli*, o repressor galR de *E. coli*, o repressor araC de *E. coli*, o repressor ArgRNV de *E. coli* (Burke *et al* (1994) *Mol. Microbiol.*, 13, 609-618) e o repressor Tet de *E. coli*. Como descrito acima, cada repressor está operacional em trans com uma sequência de operador associado em trans que está presente tanto no cromossoma como no plasmídeo. A invenção contempla a presença de um ou mais genes repressores no cromossoma do hospedeiro, p. ex., um, dois ou três genes repressores, de modo a assegurar a estabilidade do plasmídeo, em que um gene repressor cromossómico se torna mutado ou com bases removidas.

Sequências de operadores favoritas incluem por isso o operador lac, o operador de λ, o operador trp, o operador gal, o operador ara, o operador Arg e o operador Tet. Se desejável, o promotor correspondente pode estar funcionalmente associado ao seu operador.

A célula hospedeira pode ser qualquer célula incluindo células animais tais como células de mamíferos e células de insecto, células vegetais, fungos tais como leveduras e bactérias.

Numa realização preferida, a célula hospedeira é uma célula bacteriana que pode ser gram negativa ou positiva, por exemplo, *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Lactobacillus*.

Quando a célula hospedeira é uma célula eucariota são utilizados preferencialmente os repressores Lac e Tet e os seus operadores correspondentes. A utilização dos repressores Lac e

Tet para regular a expressão do gene em células eucariotas, incluindo leveduras, dictiostelium, células vegetais e plantas de tabaco é descrita por Gossen *et al* ((1984) *Current Opinions in Biotechnology*, 5, 516-520).

Podem estar presentes no cromossoma da célula mais do que um gene cromossómico essencial diferente, que está funcionalmente associado com o operador, em que o gene essencial está ligado a um operador e por isso é sensível à repressão pelo repressor, para protecção contra a perda da sensibilidade ao repressor num operador cromossómico. Numa realização preferida da invenção, o gene que codifica para a proteína repressora está presente em duas ou três cópias em diferentes localizações no cromossoma, para protecção contra a perda de expressão do repressor numa localização do cromossoma.

Genes essenciais preferidos que estão localizados no cromossoma do hospedeiro incluem, mas não estão limitados a, genes que recaem numa das seguintes categorias: os genes que codificam produtos relacionados com a biossíntese de metabolitos celulares tais como percursores da parede celular, genes cujos produtos estão envolvidos no metabolismo do carbono e genes que codificam a biossíntese ou regulação de macromoléculas, p. ex. genes essenciais para a síntese de ADN e/ou ARN e funções de replicação.

Preferencialmente, o plasmídeo compreende uma origem de replicação permitindo a replicação de cerca de 20 cópias do plasmídeo por célula hospedeira, ou tanto quanto cerca de 200 cópias do plasmídeo por célula hospedeira. Exemplos de tais plasmídeos incluem, mas não estão limitados a pBR322 e à série de plasmídeos pUC, como descritos por Vieira & Messing (1982, *Gene*, 19(3), 259-268) e Yanish-Perron *et al.* (1985, *Gene*, 33(1), 103-119), aqui referidos como pUC.

É preferido que os plasmídeos incluam um sítio de clonagem para inserção de um gene de interesse.

Numa realização especialmente preferida da invenção, o plasmídeo inclui ainda um gene de interesse. Preferencialmente, o gene de interesse é expressável numa célula de mamífero, preferencialmente humana. Exemplos de tais genes são conhecidos na técnica e aqui revelados. Se desejado, o gene de interesse não será expresso na estirpe hospedeira. Quando a estirpe hospedeira é uma bactéria, isto pode ser alcançado não incluindo um promotor bacteriano com o gene de interesse. Adicionalmente, se desejado, o gene de interesse pode estar associado à sequência do operador do plasmídeo de modo a que a expressão deste gene seja passível de ser reprimida durante o crescimento da célula hospedeira transformada pelo plasmídeo. Estes servem para reduzir a carga metabólica da célula hospedeira em produzir a proteína de interesse codificada. Alternativamente, se a expressão do gene de interesse for desejada, p. ex., quando é desejado produzir e isolar o produto codificado, o operador não necessita de estar posicionado de modo a reprimir a expressão do gene de interesse durante o crescimento celular e a expressão do gene de interesse pode ser controlada através de um promotor activo na célula hospedeira.

A invenção também compreende a célula hospedeira acima descrita, em que o plasmídeo inclui apenas as sequências necessárias para a sua replicação e manutenção na célula hospedeira. Isto é, em que o plasmídeo consiste essencialmente no operador susceptível de ligação por um repressor expresso em trans, uma origem de replicação, e um sítio de clonagem para inserção de um gene de interesse.

A invenção também compreende o plasmídeo mínimo acima descrito, i.e., consistindo essencialmente num operador susceptível de ligação por um repressor expresso em trans, uma origem de replicação, e um sítio de clonagem para inserção de um gene de interesse. Como aqui utilizado, "consistindo essencialmente em" significa que o plasmídeo contém apenas as sequências necessárias para manter o plasmídeo na estirpe

hospedeira, e um sítio de clonagem para inserção de um gene terapêutico. Isto é, o plasmídeo não contém sequências que são desnecessárias para a sua sobrevivência na célula hospedeira. Como aqui utilizado, "origem de replicação" refere-se às sequências do plasmídeo que são necessárias para manter o plasmídeo a um dado número de cópias por célula.

Preferencialmente, este plasmídeo mínimo tem cerca de 1000 pb de comprimento. Mais preferencialmente, o plasmídeo mínimo tem cerca de 2 kb de comprimento, em que o ADN contido no plasmídeo que não é a sequência do operador, nem a origem de replicação, nem o sítio de clonagem, é ADN não codificante.

É especialmente preferido que este plasmídeo mínimo contenha ainda um gene de interesse operacionalmente associado a sequências de controlo para expressão na célula alvo. Preferencialmente, a célula alvo é uma célula de mamífero e mais preferencialmente uma célula humana.

O plasmídeo mínimo possui a vantagem considerável de conter apenas sequências de ADN mínimas tais como sequências bacterianas, e assim reduz consideravelmente os problemas associados com a introdução de sequências de ADN estranho em linhas celulares de mamíferos, por exemplo, em que se pretende que um plasmídeo seja um vector para terapia génica. Assim, os problemas que são evitados de acordo com a invenção incluem expressão de genes incorporados pelo plasmídeo tais como genes bacterianos ou de leveduras numa célula alvo de mamífero, que leva à destruição da célula alvo ou do próprio hospedeiro de mamífero, ou que leva ao desenvolvimento de uma resposta imune ao ADN estranho ou a produtos codificados por tais sequências.

A invenção também compreende um método para manter um plasmídeo numa célula hospedeira, compreendendo o passo de cultivar a célula transformada acima descrita, durante um tempo e em condições suficientes para permitir que a célula cresça.

A invenção também compreende um método de produção de ADN plasmídico, compreendendo cultivar a célula transformada acima

descrita durante um tempo e em condições suficientes para permitir que a célula cresça, e isolar o ADN plasmídico da célula cultivada.

A invenção também compreende um método de produção de proteína recombinante, compreendendo cultivar a célula hospedeira transformada acima descrita durante um tempo e em condições suficientes para produzir a proteína recombinante. Preferencialmente, o método compreende ainda o isolamento da proteína recombinante. Preferencialmente, a proteína recombinante é a proteína de benefício terapêutico para um humano.

A produção de uma proteína recombinante utilizando o sistema de titulação do repressor aqui descrito confere uma carga metabólica reduzida à célula hospedeira, na medida em que a única região codificante no plasmídeo é o gene que codifica a proteína recombinante. Por isso, a célula hospedeira não precisa de suportar a produção de proteínas codificadas pelo plasmídeo para além da proteína recombinante. Adicionalmente, o sistema de titulação do repressor aqui descrito permite a produção de uma proteína recombinante na ausência de um antibiótico, evitando assim a perda de selecção do plasmídeo devido à perda de actividade do antibiótico na cultura. Além disso, a proteína recombinante isolada não será contaminada com um antibiótico.

O sistema de titulação do repressor aqui descrito permite a manutenção estável de plasmídeos em número de cópias moderado ou elevado, sem a utilização de marcadores de selecção dominantes codificados pelo plasmídeo, tais como para resistência a antibiótico, e pode ser utilizado com qualquer hospedeiro que possa suportar um sistema repressor/operador de acção trans. Uma vantagem da invenção está em confiar a manutenção do plasmídeo por outra forma que não a selecção por antibiótico das células contendo plasmídeo. Isto é, não há perda de pressão selectiva durante a fermentação devida à perda de actividade de um antibiótico. A ausência de marcadores selectivos dominantes,

tais como genes de resistência a antibióticos, no plasmídeo, como aqui descrito, é também vantajosa no sentido em que evita os problemas potencialmente sérios relacionados com a expressão daqueles genes numa célula alvo de mamífero. Assim, a invenção também evita a contaminação, de um produto que se pretende para terapia génica, com o antibiótico utilizado para selecção do vector de terapia génica. Adicionalmente, a invenção evita a indução potencial de uma resposta imune severa a tais antibióticos, p. ex., choque anafiláctico.

Uma vantagem considerável do sistema de estabilização do plasmídeo aqui descrito é que evita a utilização generalizada de genes bacterianos que codificam para resistência a antibióticos, cuja utilização tende a promover a transferência de tais genes na população bacteriana como um todo.

Outras características e vantagens da invenção serão óbvias a partir da seguinte descrição da realização preferida desta e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1 é uma representação esquemática de uma célula hospedeira transformada pelo plasmídeo de acordo com a invenção;

A Fig. 2 é uma representação esquemática de um plasmídeo mínimo de acordo com a invenção;

A Fig. 3 apresenta crescimento da estirpe de *E. coli* Hfr 3000 YA694 não transformada e transformada com pUC18 em meio mínimo contendo lactose ou glucose como fonte única de carbono, A) Hfr 3000 YA694 (Min/Gluc/B1), B) Hfr 3000 YA694 (Min/Lac/B1), C) Hfr 3000 YA694-pUC18 (Min/Gluc/B1/Ap), D) Hfr 3000 YA694-pUC18 (Min/Lac/B1/Ap);

A Fig. 4 apresenta ADN plasmídico de células cultivadas em meio mínimo contendo glucose mais ampicilina e depois inoculadas em meio mínimo contendo a) lactose e ampicilina, b) lactose, c) glucose; em que a pista 1 são padrões de λ*Hind*III, a pista 2 é

ADN plasmídico de inóculo digerido com *Eco*RI, as pistas 3 a 6 são ADN plasmídico digerido com *Eco*RI, isolado após crescimento durante aproximadamente 15, 36, 55 e 72 gerações celulares, respectivamente;

A Fig. 5 apresenta o crescimento não-reprimido de JC7623 lacZ-kan na presença de canamicina;

A Fig. 6 apresenta crescimento não-reprimido de DH1 lacZ-kan na presença de canamicina;

A Fig. 7 apresenta o crescimento não-reprimido de JC7623 dapD-kan lacZ-dapD na ausência de diaminopimelato.

DESCRIÇÃO

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes, em que são empregues os seguintes materiais e métodos. A revelação completa de cada uma das referências bibliográficas aqui citadas é aqui incorporada por referência.

A invenção baseia-se na transformação de células hospedeiras, plasmídeos e métodos para produção melhorada e manutenção de um plasmídeo numa célula hospedeira utilizando um sistema novo de titulação do repressor (Fig. 1). O ADN de plasmídeo produzido de acordo com a invenção é útil em terapia génica. O próprio plasmídeo pode consistir em certas sequências mínimas, como apresentado na Fig. 2, e é capaz de transportar um gene terapêutico de interesse. O novo sistema de titulação do repressor funciona como se segue.

O sistema, como apresentado nas Figs. 1 e 2, utiliza uma célula hospedeira 10 transformada com uma sequência 16 de ligação a proteína do repressor codificada pelo plasmídeo, i.e., um operador, e uma cópia de um gene no cromossoma do hospedeiro que codifica uma proteína repressora 12. Outro gene cromossómico 14, cujo produto é essencial para crescimento ou sobrevivência da célula hospedeira, está operacionalmente associado a (i.e., colocado sob o controlo de) um operador 16 que se liga à

proteína repressora. Na ausência do plasmídeo 15, a ligação do repressor ao operador cromossómico impede a expressão do gene essencial, e a célula apenas pode crescer na presença do indutor. A introdução subsequente de um plasmídeo que contém um sítio de ligação para a proteína repressora resulta na titulação da proteína repressora longe do operador cromossómico, permitindo assim a expressão do gene essencial. Por isso, na ausência do indutor, apenas as células que contêm o plasmídeo crescerão. Isto deve-se à presença da sequência do operador no plasmídeo permitir ao plasmídeo titular o repressor, removendo assim moléculas repressoras que estariam de outra forma disponíveis para ligação ao operador cromossómico. A titulação do repressor pelas sequências do operador plasmídico permite a expressão do gene cromossómico essencial e o crescimento apenas das células que contêm plasmídeo. Se a estirpe hospedeira é construída de modo ao repressor ser sintetizado a um número de cópias elevado, então o plasmídeo será mantido a um número ainda mais elevado de cópias.

Como apresentado na Fig. 2, o plasmídeo 15 apenas necessita incluir sequências para ligação ao operador 16, e origem de replicação 18 e um sítio de clonagem 20.

Sistemas Repressor/Operador Úteis de Acordo com a Invenção.

A invenção pode ser utilizada com qualquer sistema repressor/operador de actuação trans. Por exemplo, o sistema de titulação do repressor aqui descrito pode incluir qualquer repressor que possua uma afinidade suficiente para a sua sequência de ligação ao ADN, de modo a ser capaz de impedir a expressão de um gene cromossómico essencial, mas também é titulável através de uma sequência de ligação a ADN incorporada em plasmídeo.

O gene cromossómico essencial que é sensível à repressão pelo repressor é tornado sensível à repressão no sentido em que

é colocado sob controlo de um operador/promotor que se liga ao repressor, ou a sequência de ligação do repressor (i.e., operador) é inserida em, ou está associada com o promotor natural do gene essencial de tal modo que pode impedir a transcrição quando ligada pelo repressor, mas não destrói a capacidade do promotor natural iniciar a transcrição do gene essencial na ausência da ligação ao repressor.

Podem estar presentes no cromossoma mais do que um gene essencial diferente, p. ex., dois ou três genes, estando cada gene funcionalmente ligado a uma sequência de operador e por isso sensível a repressão pelo repressor. A presença de diferentes genes essenciais sensíveis ao repressor no cromossoma, preferencialmente em diferentes posições no cromossoma, reduz a possibilidade de perda de estabilidade de plasmídeo por via de uma mutação ou delecção resultante de perda de repressão de um gene cromossómico essencial.

O repressor é codificado por um gene cromossómico. De acordo com a invenção, uma ou mais, preferencialmente uma, duas ou três cópias do gene repressor cromossómico estão presentes na célula hospedeira. O gene repressor cromossómico pode ser um gene que ocorra naturalmente que não tenha sido modificado, ou pode conter uma mutação genética que confira à molécula do repressor uma afinidade mais elevada ou mais baixa em relação à força de ligação do seu operador correspondente. Tais mutações são conhecidas na técnica anterior, por exemplo, a afinidade do repressor lac em relação ao seu operador pode ser aumentada através de simples troca de aminoácidos (ver Betz, (1986) *Gene*, 42, 283-292 e Khoury *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.*, 219, 623-634). Alternativamente, mais ou menos cópias do sítio de ligação do operador podem ser introduzidas no plasmídeo ou mais ou menos cópias do gene repressor podem ser introduzidas no cromossoma ou, numa realização alternativa, transportadas num plasmídeo.

Alternativamente, as sequências que iniciam expressão do gene repressor tais como promotores, intensificadores, etc.

podem ser mutadas ou transformadas geneticamente de modo a que um número mais elevado ou mais baixo número de moléculas repressoras possam ser produzidas na célula. Por exemplo, o número de cópias do repressor lacI pode ser aumentado através da introdução da mutação lacIq (ver Carlos (1978) *Nature* 274, 762-765). O número de moléculas de repressor presentes nas células estará relacionado com o número de cópias do plasmídeo transportando a sequência de operador correspondente. De acordo com o sistema de titulação do repressor da invenção, a concentração do repressor presente na célula hospedeira é tal que, na ausência do plasmídeo o gene essencial de interesse não é expresso, mas na presença do plasmídeo o repressor é titulado sendo afastado do gene essencial. Quando mais do que uma cópia do gene repressor está presente no cromossoma, p. ex., duas ou três cópias, a quantidade de proteína repressora produzida na célula aumentará em relação à presença de um gene; este aumento será tido em conta na selecção de uma origem de replicação de plasmídeo correspondente, e na selecção do número de operador/genes essenciais cromossómicos que estão presentes na célula.

A força dos operadores e as afinidades dos repressores podem ser alteradas para conceber o sistema para utilização com plasmídeos de diferente número de cópias. Por exemplo, a extensão da repressão do operão lac pode ser aumentada através da introdução de um operador lac ideal auxiliar colocado optimamente (i.e. um operador lac possuindo afinidade de repressor aumentada), ou a introdução do operador ideal no promotor (Muller *et al.*, (1996) *Mol. Biol.*, 257, 21-29 e Lewis *et al.*, (1996) *Science* 271, 1247-1254). Alternativamente, a força do operador poderia ser reduzida através da introdução de um operador não ideal, do posicionamento não óptimo do operador ou da eliminação de um operador auxiliar (Muller *et al.*, (1996) *Mol. Biol.*, 257, 21-29 e Oehler *et al.*, (1990) *EMBO J.* 219, 973-979). Por exemplo, a afinidade do repressor lac para o seu

operador pode ser aumentada por alterações únicas de aminoácidos (Betz, (1986) *Gene*, 42, 283-292).

Os sistemas de repressor úteis de acordo com a invenção incluem mas não estão limitados aos seguintes. O repressor lac de *E. coli* está descrito em "The Lactose Operon", J. Beckwith, em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987 *Amer. Soc. Micro.*, pp. 1444-1452, e Dickson *et al.*, 1975, *Science* 187:27-35. O operão lac é regulado como se segue. Em condições não indutoras (tais como crescimento em glucose) LacI liga-se ao operador do operão lac e evita a transcrição de β-galactosidase (lacZ), permease da lactose (LacY) e uma transacetilase (LacA). Em condições de não indução (tais como crescimento em lactose ou adição de IPTG, um análogo não matabolizável) o repressor já não se liga ao operador e a transcrição ocorre. A expressão do operão é facilmente detectável através do ensaio para a β-galactosidase. Outros sistemas de repressor úteis de acordo com a presente invenção incluem o sistema do repressor lac acima descrito e o sistema de repressor tet, para utilização na regulação da actividade do gene em células eucariotas (Gossen *et al.*, (1994) *Current Opinions in Biotechnology*, 5, 516-520). O sistema de repressor tet tem sido utilizado em leveduras, dictiostelium, células vegetais e plantas de tabaco. Outro sistema de repressor útil de acordo com a presente invenção é o sistema de repressor ArgRNV (Burke *et al.*, (1994) *Mol. Microbiol.* 13, 609-618). O repressor ArgR normalmente apenas se liga ao seu operador na presença de Arginina. Contudo, o repressor mutante ArgRNV liga-se ao operador na ausência de arginina e permanece ligado na presença de arginina e possui um efeito transdominante. Um sítio de ligação de ArgR idealizado (operador) possuindo duas caixas Arg simétricas pode ser construído no plasmídeo de interesse para permitir a titulação de ArgRNV e o seu afastamento de um gene essencial cuja expressão é controlada através do sítio de ligação de ArgR.

Um especialista na técnica compreenderá que podem ser realizadas certas modificações no sistema repressor-titulação aqui descrito que servem para adaptar o sistema a um dado protocolo. Por exemplo, quando o meio de crescimento contém componentes que induzem, mais do que permitem, a repressão do operador, e não é desejável induzir condições durante o crescimento, podem ser utilizados mutantes do operador ou do repressor para superar a indução e permitir a repressão. Um exemplo de um repressor mutante é um mutante de LacI do repressor lac. Um mutante de LacI já não tem a capacidade de se ligar ao indutor. Exemplos de mutantes de LacI incluem, p. ex., mutantes $LacI^s$ (Beyreuthe, 1978, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY) e outros mutantes tais como Asp276 --> Asn274 (Chang *et al.*, 1994, *Biochem.* 22:3607-3616). Substituindo o repressor selvagem por um repressor mutante que é insensível ao indutor, o repressor é capaz de se ligar ao operador durante o crescimento, e o plasmídeo é mantido na célula hospedeira mesmo em condições que normalmente induzem o repressor.

O repressor trp de *E. coli* também é útil de acordo com a invenção (ver "The tryptophan Operon", Yanosfsky e Crawford, em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987, *Amer. Soc. Micro.*, pp. 1453-1472). O repressor trp está presente a cerca de 50 cópias/célula e requer a presença de triptofano no meio de fermentação como um indutor de ligação ao repressor. O repressor galR de *E. coli* também é útil de acordo com a invenção (ver "The Galactose Operon", S. Adhya, em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987, *Amer. Soc. Micro.*, pp. 1503-1512). O repressor araC de *E. coli* também é útil de acordo com a invenção (ver "The L-Arabinose Operon", R. Schlief, em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987, *Amer. Soc. Micro.*, pp. 1473-1481; Dunn *et al.*, 1984, *Proc. Nat. Aca. Sci.* 81:5017-5020). O repressor araC aumentou a afinidade de ligação na presença de arabinose. Finalmente, o repressor de λ é

útil de acordo com a invenção (Introduction to Lambda Phages, em *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel *et al.*, 1994, Secção III, Unidade 1.9; Hochschild *et al*, *Cell* 47(5);807-816).

Plasmídeos Úteis de Acordo com a Invenção

A invenção pode ser utilizada vantajosamente com uma origem de replicação do plasmídeo que permita a replicação de pelo menos 10, preferencialmente pelo menos 20-100, e mais preferencialmente pelo menos 200-500 cópias do plasmídeo por célula de hospedeiro. Estas origens de replicação que permitem a replicação de números de cópias de plasmídeos moderados (i.e., 20-50) a elevados (i.e., 200-500) são especialmente úteis, na medida em que números de cópias moderados a elevados podem facilmente titular moléculas repressoras. Certamente que, se desejável, também pode ser utilizado um plasmídeo possuindo um número de cópias tão elevado quanto 1000-2000 cópias por célula.

Os plasmídeos com um número de cópias baixo (i.e., 10 cópias ou menos) são utilizados com a máxima vantagem de acordo com a invenção após mutação para originar um número de cópias aumentado (J. Scott, 1984, *Microbial Reviews* 48:1-23). Das origens de replicação utilizadas frequentemente, pBR322 (20 cópias/célula) é útil de acordo com a invenção e pUC (a 200 cópias/célula) é preferido. Embora não sendo preferidos, outros plasmídeos que são úteis de acordo com a invenção são os que requerem a presença de proteínas para replicação codificadas pelo plasmídeo, por exemplo, as origens de replicação de pT181, FII e FI.

Exemplos de origens de replicação que são úteis de acordo com a invenção em *E. coli* e *S. typhimurium* incluem, mas não estão limitados a pMB1 (25 ou mais cópias por célula, Bolivar *et al.*, 1977, *Gene* 2:95-113), ColE1 (15 ou mais cópias por célula, Kahn *et al.*, 1979, *Methods Enzymol.* 68:268-280), p15A (cerca de

15 cópias por célula, Chang *et al.*, 1978, *J. Bacteriol.* 134:1141-1156); pSC101 (cerca de 6 cópias por célula, Stoker *et al.*, 1982, *Gene* 18:335-341); R6K (menos de 15 cópias por célula, Kahn *et al.*, 1979, supra); R1 (origem de replicação dependente de temperatura, Uhlin *et al.*, 1983, *Gene* 22:255-265); lambda dv (Jackson *et al.*, 1972, *Proc. Nat. Aca. Sci.* 69:2904-2909). Um exemplo de uma origem de replicação que é útil em *Staphylococcus* é pT181 (cerca de 20 cópias por célula, J. Scott, 1984, *Microbiol Reviews* 48:1-23. Das origens de replicação acima descritas, pMB1, p15A e ColE1 são preferidas porque essas origens não requerem proteínas para replicação codificadas pelo plasmídeo.

Células Hospedeiras Úteis de Acordo com a Invenção.

A invenção é aplicável a todos os tipos de célula, incluindo células animais tais como células de mamíferos e de insectos, células vegetais, fungos tais como leveduras, e a maior parte das estirpes de bactérias, por exemplo estirpes de bactérias gram positivas e gram negativas, desde que exista um plasmídeo capaz de ser mantido na célula hospedeira num número de cópias médio a elevado.

As bactérias gram negativas úteis de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitadas a, *E. coli* e *Salmonella*, p. ex., *S. typhimurium*.

As espécies gram positivas úteis de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitadas a, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, para as quais já existem plasmídeos de elevado número de cópias. Exemplos de plasmídeos úteis de acordo com a invenção em *Lactococcus* são pNZ2123 e pIL253 (Simon *et al.*, *Biochimie* 70:559). O operão da lactose de *Lactococcus* tem sido utilizado para controlar a expressão de proteínas heterólogas (Wells *et al.*, 1993, *Mol. Microbiol.* 8(6):1155-1162). Este operão utiliza o repressor lacR (van Rooigen *et al.*,

J. Biol. Chem. 265:18499-18503, 1990) para controlar a expressão da polimerase de T7, que controla a expressão da proteína heteróloga. Exemplos de plasmídeos úteis de acordo com a invenção em *Bacillus* são pC194, pUB110 e pT181.

Em *Bacillus*, p. ex., *B. subtilis*, o repressor de λ tem sido utilizado para controlar a expressão de proteínas heterólogas. O repressor de λ tem sido colocado sob o controlo do promotor sak42D, que pode ser transcrito eficientemente em *B. subtilis* (Breitling *et al.*, 1990, *Gene* 93(1):35-40).

As leveduras são úteis de acordo com a invenção, na medida em que são mantidos em leveduras plasmídeos de elevado número de cópias. Exemplos de tais plasmídeos incluem os plasmídeos YRp (baseados nas sequências de replicação autónoma (ARS)) que possuem números de cópias até 100 cópias por célula, e os plasmídeos Yep (baseados no círculo de 2 micron), com um número de cópias de 50-100 por célula. (Ver Sikorski, "Extrachromasomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*", em *Plasmids, A Prectical Approach*, Ed. K.G. Hardy, IRL Press, 1993; e *Yeast Cloning Vectors and Genes*, Section II, Unit 13.4, *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds., Ausubel *et al.*, 1994). As leveduras são capazes de expressar o gene lacZ de *E. coli*, por isso está contemplada de acordo com a invenção, a utilização do sistema de titulação do repressor lac para controlar a expressão de genes de leveduras essenciais, tais como ura3 ou leu2, genes que têm sido utilizados para a manutenção de plasmídeos em leveduras (Gunge, 1983, *Ann. Rev. Micro.* 37:253-276).

Genes Essenciais Úteis de Acordo com a Invenção.

A invenção pode ser utilizada em conjugação com um número de diferentes genes essenciais do cromossoma do hospedeiro para a manutenção estável do plasmídeo. Estes genes essenciais incluem, mas não estão limitados às seguintes categorias, p. ex., produtos codificados por genes relacionados com a

biossíntese de metabolitos celulares, genes cujos produtos estão envolvidos no metabolismo do carbono e genes que codificam para a biossíntese ou regulação de macromoléculas, p. ex., genes essenciais para funções de síntese e replicação de ADN e/ou ARN.

1. Genes Essenciais que Codificam Produtos Relacionados com a Síntese de Componentes da Estrutura Celular.

Certos genes que codificam enzimas envolvidos no fornecimento de componentes celulares, em particular o fornecimento de percursores da parede celular, são também essenciais para o crescimento celular e são úteis de acordo com a invenção. Por exemplo, a célula bacteriana contém ácido meso-diaminopimélico (DAP), e a incapacidade de sintetizar este componente resulta em lise celular. Foi demonstrado que mutantes nos quais o gene asd (desidrogenase de β-semialdeído de aspartato) ou o gene dapD (aminotransferase de diaminopimelato de succinilo) são removidos podem ser utilizados para a manutenção de plasmídeos que contêm uma cópia completa desse gene no plasmídeo. (Nakayama *et al.*, *Bio/technology* 6:693-697, 1988; DeGryse, U.S. Pat. 5 198 343). Um número de outros genes na via biossintética de DAP também podem ser utilizados, nomeadamente dapA, dapB, dapC e dapE. Os dapA e dapB foram clonados e sequenciados e dapB está disponível como um cistrão único (Richaud *et al.*, *J. Bacteriol.* 166:297-300, 1986; Bouvier *et al.*, *J. Biol. Chem.* 259:14829-14834, 1984). Os genes envolvidos na biossíntese de outros componentes da parede celular, tais como a biossíntese de D-alanina, são também úteis de acordo com a invenção (Walsh, 1989, *J. Biol. Chem.* 264(5):2393-2396). Uma sequência de ADN codificando um componente para D-alanina tem sido utilizada para a estabilização de plasmídeos sem a utilização de antibióticos (ver EP 85/309020).

A invenção contempla a utilização de titulação de repressor em conjugação com tais genes. O gene de interesse é primeiro removido da estirpe hospedeira de modo a que o hospedeiro tenha

agora uma necessidade para o produto desse gene (Winans *et al.*, 1985, *J. Bact.* 161(3):1219-1221; Jasin *et al.*, 1984, *J. Bact.* 159(2):783-786). É então construída uma cópia do gene utilizando técnicas de clonagem convencionais, de modo a que a sua expressão seja dirigida pelo promotor/operador que se liga à proteína repressora escolhida. Esta construção é então introduzida no cromossoma da estirpe hospedeira que sintetiza a proteína repressora (Winans *et al.*, 1985, *J. Bact.* 161(3):1219-1221; Jasin *et al.*, 1984, *J. Bact.* 159(2):783-786). A transformação da estirpe com um plasmídeo contendo a sequência de ligação ao repressor resulta em titulação do repressor afastando-o do gene biossintético, permitindo a expressão do gene essencial.

2. Genes Essenciais para o Crescimento Celular.

O método de titulação do repressor da invenção pode ser utilizado com genes envolvidos na utilização de fontes de carbono. Especificamente, o método pode ser utilizado com o operão da lactose e a utilização de lactose como fonte única de carbono, como aqui descrito. Outras modificações serão óbvias para um especialista na técnica. Existem mutantes do repressor lac que já não são capazes de se ligar ao indutor (alolactose) e permanecem ligados ao operador lac em condições normais de indução. Estes são tipificados pelos mutantes $lacI^s$; contudo, existem outras mutações que não têm capacidade para se ligar ao indutor, mas são normais em todas as outras funções (Chang *et al.*, *Biochem.*, 33:3607-3616 (1994)). As estirpes transportando estas mutações não seriam capazes de exprimir os genes do operão lac e por isso não seriam capazes de crescer com lactose como única fonte de carbono. A transformação de tais estirpes com plasmídeos de número de cópias elevado contendo sequências do operador lac selvagens irá remover o repressor do operão lac por titulação e permitir crescimento em lactose.

A sintetase de glutamina é um gene essencial para células eucariotas tais como a linha celular de mieloma NSO (Bebbington

et al., (1992) *Bio/Technology* 10, 169-175) e é utilizado preferencialmente quando a célula hospedeira é uma célula eucariota.

3. Genes Codificando a Síntese de Ácidos Nucleicos.

A invenção também pode ser utilizada em conjugação com genes essenciais codificando a síntese de ADN e/ou ARN ou proteínas de replicação da célula hospedeira. Exemplos de tais genes em relação a estas funções essenciais em bactérias tais como *E. coli* e *Salmonella* são fornecidos em McMacken *et al.* (em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium, Celular and Molecular Biology*, Ed. Neidhardt *et al.*, *Amer. Soc. Micro.*, Wash. D.C., 1987, pp. 564-612), e incluem mas não estão limitados aos seguintes genes: dnaA, dnaB, dnaC, ssb, dnaG, polC (dnaE), dnaQ (mutD) dnaN, dnaZX, gyrA, gyrB, polA, lig, dnaT, rpoA, rpoB, rpoC, e rpoD.

No Exemplo I, a invenção é aplicada utilizando o sistema repressor/operador lac em experiências que demonstram a capacidade de sequências incorporadas em plasmídeos para titular o repressor afastando-o do gene cromossómico.

Exemplo I

A estirpe de *E. coli* DH1 (Hanahan, *J. Molec. Biol.* 166:557-580, 1983) possui um operão da lactose intacto, que é sujeito a controlo através da proteína do repressor da lactose (LacI). LacI está presente a 10-20 cópias por célula e liga-se com elevada afinidade (kd 1x10-14).

E. coli DH1 foi transformada com pUC18tet (um plasmídeo baseado em pUC18 contendo genes de resistência à ampicilina e à tetraciclina, que está presente a aproximadamente 100-200 cópias por célula). O pUC18test contém o operador/promotor lac mas não contém o gene LacI codificando a proteína do repressor. O plasmídeo também contém a origem de replicação de pUC e um "polylinker" (ou sítio de clonagem múltiplo) para inserção de um

gene terapêutico. A resistência à ampicilina e tetraciclina codificada pelo plasmídeo não é necessária para a titulação do repressor, e um plasmídeo não contendo resistência a antibiótico é preferido de acordo com a invenção e pode ser prontamente substituído por pUC18tet.

DH1 e DH1::pUC18tet foram crescidos em meio de sais mínimo M9 com lactose (10 mM) ou glucose (10 mM) como fontes de carbono suplementadas com ampicilina (50 μg/mL) quando necessário. As células foram recolhidas durante o crescimento logarítmico e ensaiadas para a actividade de β-galactosidase (Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY). Como apresentado na Tabela 1, actividades de β-galactosidase comparáveis são observadas com DH1:pUC18tet crescidas em glucose e lactose enquanto que são observadas actividades muito mais baixas com o crescimento de DH1 em glucose, em comparação com lactose. A presença do plasmídeo, por isso, titula o repressor afastando-o do operador lac, permitindo a expressão de β-galactosidase.

Tabela 1

Expressão de β-galactosidase em *E. coli* DH1 na presença e ausência de pUC18tet quando crescido em condições de indução e não indução.

Experiência 1	DH1		DH1::pUC18tet	
	Actividade (unidades)	%	Actividade (unidades)	%
Lactose	1391	100	4162	300
Glucose	27	2	3120	224

Experiência 2	DH1		DH1::pUC18tet	
	Actividade (unidades)	%	Actividade (unidades)	%
Lactose	2571	100	7140	277
Glucose	9	0	6466	255

Experiência 3	DH1		DH1::pUC18test	
	Actividade (unidades)	%	Actividade (unidades)	%
Lactose	1123	100	1400	125
Glucose	29	2,5	1157	103

Os resultados são de três experiências independentes e estão expressos como unidades e como uma percentagem do valor obtido para lactose crescida em DH1 para cada experiência.

Exemplo II

Demonstração da titulação do repressor.

A estirpe de *E. coli* Hfr 3000 YA 694 (CGSC 6378) *lac*I694, *rel*A1, spoT1, thi-1, λ, foi plaqueada em EMB agar e crescida durante a noite, resultando em colónias cor-de-rosa indicando que a estirpe é incapaz de fermentar lactose e possui o genótipo $lacI^s$, i.e. codifica um repressor que é insensível ao indutor (Wison *et al.*, (1964) *J. Mol. Biol.*, 8:582). Uma colónia isolada foi crescida e tornada competente para transformação. Esta estirpe foi então transformada com pUC18 (que contém o operador *lac* e está descrita acima) e plaqueada em EMB agar contendo ampicilina. As colónias resultantes eram pretas indicando que a lactose foi fermentada como resultado do repressor $lacI^s$ ter sido titulado e afastado do operão lac permitindo a expressão do gene da β-galactosidase. Um colónia isolada foi inoculada em 5 mL de LB com ampicilina e crescida até à fase logarítmica média e mostrou apresentar actividade de β-galactosidase.

A estirpe de *E. coli* Hfr 3000 YA694 não transformada e transformada com pUC18 foi plaqueada em meio mínimo contendo lactose ou glucose como única fonte de carbono suplementada com ampicilina quando necessário. Pode ser observado na Fig. 3 que a

introdução de pUC18 resultou na capacidade de crescer em lactose.

Exemplo III

Demonstração de manutenção de plasmídeo por titulação do repressor.

A estirpe de *E. coli* YA694 contendo pUC18 foi inoculada em 5 mL de meio mínimo M9 suplementado com glucose (0,1 g/L), ampicilina (50 µg/mL) e tiamina (0,5 mg/L) e cultivada a 37°C durante 14 h. Foram então inoculados 0,5 mL desta cultura separadamente em:

(1) 100 mL de meio M9 suplementado com glucose,
(2) 100 mL de meio M9 suplementado com lactose,
(3) 100 mL de meio M9 suplementado com lactose e ampicilina.

As culturas foram então cultivadas durante aproximadamente 8 h a 37°C. As medições de DO600 foram realizadas ao longo do período de crescimento. Foram removidas 2 unidades de DO no final do período de crescimento, recolhidas e congeladas. Foram então inoculados 0,5 mL de cada cultura em 100 mL de meio fresco respectivo e crescidos durante mais 14 h. O procedimento foi então repetido para atingir aproximadamente 72 gerações de crescimento sendo as amostras colhidas em pontos apropriados.

O ADN plasmídico foi então isolado das células recolhidas, digerido com *Eco*RI e analisado por electroforese em gel. Os resultados indicam que após 72 gerações de crescimento o plasmídeo estava presente a um rendimento específico superior em células cultivadas apenas em lactose do que em células cultivadas apenas em glucose (Fig. 4). Isto demonstra que tornando o crescimento dependente da produção de β-galactosidase

para metabolizar lactose, o plasmídeo, que permite a expressão do gene da β-galactosidase, é mantido selectivamente.

Exemplo IV

Demonstração de repressores alternativos.

A capacidade do repressor mutante ArgRNV para actuar como um repressor que pode ser utilizado no sistema de titulação de repressor foi investigada. ArgRNV, um mutante de ArgR construído geneticamente (Burke *et al.*, 1994, *Mol. Microbiol.* 13(4), 609-618), permanece ligado ao seu sítio de ligação de ADN dentro dos promotores dos genes biossintéticos de arginina, mesmo na ausência de arginina. A transformação das estirpes de *E. coli* DS997 e DS998 com o gene ArgRNV num plasmídeo de cópias múltiplas mostrou prevenir o crescimento em meio mínimo (Burke *et al.*, 1994, *Mol. Microbiol.* 13(4), 609-618). O repressor como tal exibe transdominância. A experiência foi repetida com *E. coli* DH1 que foi transformada com ArgRNV codificada num plasmídeo de elevado número de cópias (pSelect, Promega), ocorreu apenas crescimento subsequente em meio mínimo na presença de arginina, demonstrando a capacidade do repressor para ser utilizado num sistema de titulação do repressor.

O gene ArgRNV podia ser colocado no cromossoma de DH1 e investigada a capacidade para prevenir o crescimento em meio mínimo. A capacidade de plasmídeos conterem o sítio de ligação de ArgR para titular o ArgRNV dos genes biossintéticos de arginina ou de um gene essencial associados funcionalmente ao operador Arg pode ser investigada.

Exemplo V

Criação de uma fusão lacZ canamicina.

Uma fusão em grelha de uma região do terminal N do gene *lacZ* e do gene da canamicina para ser utilizada como modelo de um gene essencial sob o controlo do operador/promotor lac foi construída do seguinte modo (o gene da canamicina pode ser substituído por qualquer gene essencial). A "cassette" da canamicina foi removida de pUC4K (Pharmacia Biotech) através da digestão com *Xho*I e *Pst*I, isto foi ligado a pUC18 que tinha sido digerido com *Sal*I e *Pst*I. Isto criou uma fusão funcional em grelha do gene *lacZ* com o gene da canamicina, de modo a que a expressão da resistência à canamicina estivesse sob o controlo do promotor do operador lac.

A construção lac/canamicina foi isolada por digestão com *Hae*II, tornada romba e ligada a pN1 que tinha sido digerido com *Sty*I e tornado rombo. O pN1 é um plasmídeo baseado em pUC18 contendo 5,5 kb de ADN cromossómico de *E. coli* rodeando o "locus" *dif* (Leslie *et al.* 1995, *EMBO J.*, 14, 1561-1570). A inserção de lac/canamicina no "locus" *dif* de pN1 em última análise permitiu a recombinação da construção no cromossoma do hospedeiro de *E. coli* desejado. O plasmídeo resultante foi linearizado com *Sal*I e utilizado para transformar *E. coli* JC7623 (Winans *et al.* 1985, *J. Bact.*, 161(3), 1219-1221) e seleccionado em placas de canamicina + IPTG. Os clones resistentes à canamicina foram testados quanto à capacidade de indução por IPTG para o crescimento na presença de canamicina (Fig. 5), à perda de plasmídeo e à inserção da construção no cromossoma através de análise de Southern.

A construção foi então transferida do cromossoma de JC7623 para o cromossoma de DH1 através da transdução de P1. A estirpe de DH1 lac/kan resultante foi analisada por análise de Southern quanto à presença da construção no "locus" *dif* e à capacidade de indução de resistência à canamicina (Fig. 6). A transfecção de

DH1 lacZ-kan com pUC18TET resultou em crescimento em canamicina sem IPTG demonstrando a titulação do repressor para o gene de resistência à canamicina. Demonstrando assim a adequabilidade da célula hospedeira para a manutenção do plasmídeo na presença de canamicina.

A estirpe DH1 lac/kan foi então transformada com um número de plasmídeos possuindo o operador *lac* (pUC18, pUC18TET e plasmídeos maiores derivados destes) e testada para:

1. Crescimento em meio contendo canamicina (60 μg/mL) em condições de não indução;

2. Manutenção do plasmídeo durante o crescimento em descontínuo por meio do sistema de titulação do repressor.

A titulação do repressor *lac* longe da construção *lac*/canamicina foi demonstrada e a manutenção do plasmídeo durante o crescimento descontínuo foi também demonstrada.

Exemplo VI

Foi realizada a construção e a inserção de uma construção de fusão lacZdapD no "locus" *dif* de uma estirpe de *E. coli* DH1 dapD, de modo a proporcionar um gene essencial sob o controlo do operador/promotor lac.

Construção de uma fusão lacZdapD

O gene *dap*D foi clonado a partir de DH1 por PCR utilizando iniciadores nos quais os sítios *Eco*EI tinham sido modificados (5'GTGCCCGAATTCCAATTGGCG-3', 5'-CGGCGTGAATTCATCGCTCATCCC-3'). O produto de PCR foi digerido com *Eco*RI e ligado em pUC18 digerido com *Eco*RI. O plasmídeo resultante (pUC18dapD) foi utilizado para

transformar a estirpe de *E. coli* AT982 (*dap*D4, *thi*1, *rel*A1, λ-, *spo*T1) e demonstrou complementar a mutação *dap*D demonstrando que o gene *dap*D tinha sido clonado. Foi então criada uma fusão do gene *dap*D com o gene *lac*Z de pUC18 através de PCR utilizando pUC18dapD e os oligonucleótidos:

5'-CAATGCAGAATTCACAGAACATTA-3' e
5'-CGGCGTGAATTCATCGCTCATCCC-3'.

A digestão com *Eco*RI e a ligação em pUC18 que tinha sido digerida com *Eco*RI criou uma fusão em grelha entre os genes *lac*Z e *dap*D. Esta construção (pUC18dapD2) demonstrou ser novamente funcional através do restabelecimento do crescimento de AT982 após transformação.

A fusão lac/dapD foi isolada como um fragmento *Hae*II, tornada romba e ligada em pN1 que tinha sido digerido com *Sty*I e depois tornado rombo. Este plasmídeo (pN1 dap D2) complementou a mutação *dap*D na estirpe AT982.

Como será óbvio para um especialista na técnica, podem ser realizadas modificações às construções incluindo, por exemplo, modificações às várias sequências de controlo.

Inactivação do gene *dap*D de DH1 WT.

Antes da inserção da fusão *lacZdap*D no cromossoma de DH1 foi primeiro inactivada a expressão do gene WT. O gene *dap*D foi reclonado por PCR com fragmentos maiores de ADN 5' e 3' para o gene *dap*D utilizando os oligonucleótidos:

5'-TCATCGGAATTCCCTGGAGTATCGG-3' e
5'-TGAGCTGAATTCCATCGCCGCGCTG-3', para permitir recombinação mais eficiente. O produto de PCR resultante foi digerido com *Eco*RI e

ligado em pUC18 no qual o sítio *Pst*I tinha sido removido. O plasmídeo resultante (pUC18 dapD3) complementou a mutação *dap*D em AT982. O gene *dap*D foi então inactivado por inserção através da introdução da "cassette" da canamicina de pUC4K no sítio *Pst*I localizado no gene *dap*D. Este plasmídeo (pUC18dapDkan) já não complementava a mutação *dap*D em AT982. A construção foi introduzida no cromossoma de *E. coli* JC7623 por transformação com pUC18dapDkan que tinha sido linearizado por digestão com *Bam*HI. Os clones foram pesquisados quanto à incapacidade para crescer na ausência de diaminopimelato suplementar, mas capacidade para crescer na presença de canamicina. A presença do gene da canamicina no gene *dap*D foi confirmada por análise de Southern. O gene inactivado de *dap*D foi então transferido para o cromossoma de DH1 por transdução P1 para produzir DH1 *dap*D*kan*.

A construção lacZdapD foi introduzida no cromossoma de JC7623dapDkan por transformação com pN1dapD2 que tinha sido linearizado com *Sca*I. Os clones foram isolados e foi então demonstrada a indução do crescimento por IPTG na ausência de diaminopimelato (Fig. 7).

A fusão lac/dapD foi então introduzida em DH1dapDkan por meio de transdução de P1 e pesquisa para indução do crescimento com IPTG e sua localização no "locus" *dif* confirmada por análise de Southern.

A estirpe de DH1 *dap*D*kan-lacdap*D foi então transformada com plasmídeo possuindo o operador lac (pUC18Tet) e foram demonstradas as seguintes cacarcterísticas:

1. Crescimento de DH1 *dap*D*kan-lacdap*D-pUC18Tet em meio mínimo sem diaminopimelato em condições de não indução, demonstrando titulação do repressor lac longe da construção lac/dapD;

2. A manutenção do plasmídeo foi testada durante crescimento descontínuo e os rendimentos de plasmídeo comparados com células cultivadas na presença de tetraciclina (i.e. para seleccionar o plasmídeo por meio do gene da resistência a antibióticos) e as células foram cultivadas na presença de um indutor (IPTG) (i.e. condições em que a manutenção do plasmídeo não é necessária). O rendimento específico do plasmídeo na ausência de tetraciclina foi comparável ao observado na presença de tetraciclina, o que demonstra a manutenção selectiva do plasmídeo na ausência de antibióticos. Em ambos os casos o rendimento foi significativamente maior do que para células cultivadas na presença de um indutor.

Exemplo VII

O ADN plasmídico mantido de uma forma estável numa célula hospedeira de acordo com a invenção é isolado como se segue. As células foram lisadas e o ADN plasmídico purificado de acordo com métodos bem conhecidos na técnica, e como descritos por Brinboim *et al.*, 1979, *NAR* 7:1513-1523, e Birnboim, 1983, *Methods Enzymol.* 100:243-255, ou utilizando um "kit" de plasmídeos da Qiagen mini, maxi ou mega (Qiagen, Chatsworth, CA). Para purificação de ADN de plasmídeo em grande escala, p. ex., 100 mg ou mais, ver Horn *et al.*, 1995, *Human Gene Therapy* 6:565-573.

Exemplo VIII

Quando um gene de interesse codificando uma proteína recombinante é transportado no plasmídeo de modo a que esteja sob controlo de sequências reguladoras da célula hospedeira (i.e., minimamente, um promotor que funciona na célula hospedeira), a proteína recombinante pode ser produzida durante o crescimento celular e depois isolada de acordo com métodos

conhecidos na técnica, como se segue. A produção e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli* é realizada como descrito em Das, 1990, "Overproduction of proteins in *E. coli*: Vectors, host and strategies", *Methods in Enzymol.* 182:93-112; Marston *et al.*, 1990, "Solubilization of protein aggregates", *Methods in Enzymol.* 182:264-276; e Thatcher *et al.*, 1994, "Protein folding in biotechnology", em Mechanisms of Protein Folding, Ed. R.H. Pain, Frontiers in Molecular Biology Series, IRL Press, Oxford University, Reino Unido.

A produção e purificação de proteínas recombinantes solúveis e/ou periplásmicas em *E. coli* pode ser realizada como descrito em Hart *et al.*, 1994, *Bio/Technology* 11:1113-1117; Schein, 1989, *Bio/Technology* 7:1141-1149; e Lavallie *et al.*, 1993, *Bio/Technology* 11:187-193.

A produção e purificação de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae* pode ser realizada como descrito em Romanos *et al.*, 1992, "Foreign gene expression in yeast; a review", em *Yeast* 8:423-488.

A produção e purificação de proteínas recombinantes na levedura *Pichia pastoris* podem ser realizadas como descrito em Sreekrishna *et al.*, 1989, *Biochemistry* 28:4117-4125.

A produção e purificação de proteínas recombinantes em células de mamífero podem ser realizadas como descrito em Reff, 1993, *Curr. Opin. Biotech.*, 4, 573-576, ou em Cartwright, 1994, *Animal Cells as Bioreactors*, Cambridge Studies in Biotechnology, 11, Cambridge University Press.

Utilização e Administração

O ADN de plasmídeo produzido de acordo com a invenção é útil em terapia génica quando o plasmídeo contém um gene terapêutico. Um gene terapêutico é um que é expressável numa célula de mamífero, preferencialmente de humano, e codifica ARN ou um polipéptido que é de benefício terapêutico para um mamífero, preferencialmente um humano. Exemplos de tais genes são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados

a, o gene da β-glucocerebrosidase, o gene da quinase de timidina de Bruton, genes que codificam para citoquinas, tais como TNF, interleuquinas 1-12, interferões (α, β, γ), receptor de Fc, e receptor de células T. Outros exemplos incluem genes codificando inibidores de HIV, p. ex., mutantes TAT ou REV que actuam como inibidores competitivos das proteínas naturais. O ADN plasmídico pode também incluir genes marcadores, tais como genes de resistência a fármacos, o gene da β-galactosidade, o gene da redutase de dihidrofolato e o gene da transferase de acetilo de cloranfenicol.

A utilização de cada ADN *in vivo* ou *ex vivo* em que o gene terapêutico codifica um produto de importância fisiológica, tal como substituição de um gene deficiente ou uma função de gene adicional potencialmente benéfica, é esperada conferir modificação genética das células a longo prazo e ser eficaz no tratamento da doença.

O ADN de plasmídeo contendo um gene terapêutico é administrado utilizando um modo viral ou não viral de terapia génica *in vivo* ou *ex vivo*. O modo de administração não é crítico para a invenção e pode incluir a utilização de um disparador de genes para a administração de ADN nu, terapia génica mediada por receptor, p. ex., utilizando complexos liposoma/anticorpo, e vectores virais.

Por exemplo, um doente que é sujeito a uma doença viral ou genética pode ser tratado de acordo com a invenção por via de modelos *in vivo* ou *ex vivo*. Por exemplo, em tratamentos *in vivo* o ADN plasmídico da invenção pode ser administrado ao doente, preferencialmente numa solução biologicamente compatível ou num veículo de distribuição farmaceuticamente aceitável, por ingestão, injecção, inalação ou qualquer número de outros métodos. As dosagens administradas variarão de doente para doente; uma "dose terapeuticamente eficaz" será determinada através do nível de aumento da função do material genético transferido equilibrado contra qualquer risco ou efeitos

colaterais prejudiciais. Os níveis de monitorização da introdução de genes, a expressão de genes e/ou a presença ou níveis do produto codificado auxiliarão na selecção e ajuste das dosagens administradas. Geralmente, será administrada uma composição incluindo um veículo de distribuição, numa dosagem única no intervalo de 10 ng - 100 μg/kg de peso corporal, preferencialmente no intervalo de 100 ng - 10 μg/kg de peso corporal, de modo a que pelo menos uma cópia do gene terapêutico seja distribuída a cada célula alvo.

O tratamento *ex vivo* também está contemplado na presente invenção. Podem ser removidas populações de células do doente ou fornecidas por outro meio, transduzidas num plasmídeo contendo um gene de tratamento de acordo com a invenção, que é reintroduzido no doente.

As células alvo para a transferência de gene *ex vivo* de acordo com a invenção incluem quaisquer células para as quais seja desejável a distribuição do gene terapêutico, por exemplo, células do sistema imunitário, tais como células T, células B e macrófagos, células hematopoiéticas e células dendríticas. Utilizando tecnologias estabelecidas, podem ser utilizadas células da medula para transferência de genes após procedimentos de enriquecimento. Alternativamente, células hematopoiéticas não separadas e populações de células da medula podem ser tornadas sensíveis à incorporação de ADN como aqui descrito.

São descritos abaixo dois plasmídeos representativos para tratamento de doenças genéticas humanas. Um plasmídeo de acordo com a invenção pode ser utilizado para tratar β-globulinemia ligada ao X. Este plasmídeo conterá as sequências mínimas aqui descritas, i.e., uma origem de replicação para replicação numa célula hospedeira de bactéria ou de levedura, uma sequência operadora e um sítio para inserção de um gene terapêutico. Por exemplo, o plasmídeo pUC18tet pode ser utilizado como um plasmídeo mínimo, preferencialmente com o gene tet removido. O gene terapêutico pode ser o gene da quinase de Bruton (Vetrie *et*

al., 1993, *Nature* 361:226-233), e é transportado nos seguintes fragmentos de ADN, que são clonados em conjunto utilizando procedimentos bem conhecidos na técnica. O gene humano da Quinase da Tirosina de Bruton é transportado num fragmento de 2,1 kb delineado pelo sítio *Pvu*I na posição (+33) e o *Hind*III na posição (+2126). Se desejado, o plasmídeo também pode incluir sequências que conferem posição independente, expressão de gene específica para o tecido, como revelado em PCT/GB88/00655. O gene terapêutico também pode codificar um sítio de separação e uma cauda poli A, que pode incluir porções da separação do "locus" da β globina humana e sinais poli A; i.e., uma sequência flanqueadora da separação 3' *Bam*HI - *Xba*I de 2,8 kb/poli A, contendo as sequências de exão 2 - IVSII - exão 3 - poli A.

O ADN plasmídico pode ser preparado como aqui descrito e utilizado para tratar β-globulinemia ligada ao X através da introdução da construção directamente num doente para terapia génica *in vivo* ou em células pré-B para terapia *ex vivo*, como descrito em Martensson *et al.*, *Eur. Jour, Immunol.* 1987, 17:1499; Okabe *et al.*, *Eur. Journ. Immunol.* 1912, 22:37; e Banerji *et al.*, *Cell* 33:729, 1983, e administrando as células pré-B transfectadas num doente afectado por β-globulinemia ligada ao X.

O ADN plasmídico preparado de acordo com a invenção pode ser também utilizado para tratamento de doença de Gaucher. A doença de Gaucher tem origem em uma ou duas mutações genéticas diferentes. Gaucher do tipo 1 é uma mutação CGG --> CAG, que resulta numa substituição Arg --> Gln na posição 119 do polipéptido da β-glucocrebrosidase (Graves, *DNA* 7:521, 1988). Gaucher do tipo 2 é uma mutação CTG --> CCG, que resulta numa substituição Leu --> Pro na posição 444 do polipéptido da β-glucocerebrosidase (Tsuji, NEJM 316:570, 1987). Crê-se que a presença de um gene da β-glucocerebrosidase codificando para um polipéptido selvagem corrija substancialmente a doença de

Gaucher. Por isso, outro plasmídeo útil de acordo com a presente invenção é um que contenha os elementos mínimos aqui descritos (i.e., uma origem de replicação, uma sequência operadora e um sítio de clonagem) e o promotor do gene da lisozima e o transgene β-glucocerebrosidase, como descrito em Horowitz *et al.*, 1989, *Genomics* 4:87-96. Este plasmídeo é construído como se segue.

O gene da β-glucocerebrosidase humana é transportado, como revelado em Horowitz *et al.*, num fragmento de 9722 pares de bases que se estende desde um sítio *Bam*HI no exão 1 até um sítio 3' *Eco*RV para o sítio de poliadenilação. Este fragmento contém 11 exões e todas as sequências intervenientes, com início de tradução no exão 2. As sequências que conferem expressão genética independente da posição e específica para o tecido podem ser incluídas na construção e são realizadas num fragmento *Xho*I - *Sac*I de 11,8 kb da construção pIII.lyx como descrito em Bonifer *et al.*, 1990, *Euro. Mol. Biol. Org. Jour.* 9;2843.

O ADN plasmídico é preparado como aqui descrito e é então utilizado para tratar a doença de Gaucher introduzindo o ADN directamente no hospedeiro para tratamento *in vivo*, ou em macrófagos para terapia *ex vivo*, como descrito em *Immunology and Cell Biology*, 1993, Vol. 71, páginas 75-78 e introduzindo os macrófagos transfectados num doente afectado com a doença de Gaucher. A expressão do transgene selvagem num doente afectado com doença de Gaucher deveria resultar em correcção do estado de doença.

OUTRAS REALIZAÇÕES

Serão evidentes outras realizações para os especialistas na técnica. Deve ser entendido que a descrição detalhada apresentada é fornecida apenas para esclarecimento e é meramente exemplificativa. O âmbito da presente invenção não está limitado

aos exemplos anteriores, mas é definido pelas seguintes reivindicações.

Lisboa, 11 de Abril de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

REIVINDICAÇÕES

1. Célula hospedeira transformada num meio de cultura, contendo a célula hospedeira um plasmídeo compreendendo um operador susceptível de se ligar a um repressor, um primeiro gene presente no cromossoma que codifica para o referido repressor, e um segundo gene presente no cromossoma, que está funcionalmente associado ao referido operador e é essencial para o crescimento celular no meio, em que o referido plasmídeo está presente na referida célula em números suficientes para titular o referido repressor de modo a que o gene essencial seja expresso, permitindo assim o crescimento celular, desde que o referido segundo gene cromossómico não seja um gene de resistência a antibiótico.

2. Célula hospedeira transformada num meio de cultura, contendo a célula hospedeira um plasmídeo compreendendo um operador susceptível de se ligar a um repressor, um primeiro gene presente no cromossoma que codifica para o referido repressor, e um segundo gene presente no cromossoma, que está funcionalmente associado ao referido operador e é essencial para o crescimento celular no meio, em que o referido plasmídeo está presente na referida célula em números suficientes para titular o referido repressor de modo a que o gene essencial seja expresso, permitindo assim o crescimento celular, e em que o segundo gene cromossómico é necessário para a biossíntese de um metabolito celular, metabolismo do carbono, biossíntese ou regulação de macromoléculas ou para funções de síntese e replicação de ADN e/ou ARN.

3. Célula hospedeira transformada num meio de cultura, contendo a célula hospedeira um plasmídeo compreendendo um operador susceptível de se ligar a um repressor, um primeiro gene presente no cromossoma que codifica para o referido repressor, e um segundo gene presente no cromossoma, que está funcionalmente associado ao referido operador e é essencial para o crescimento celular no meio, em que o referido plasmídeo está presente na referida célula em números suficientes para titular o referido repressor de modo a que o gene essencial seja expresso, permitindo assim o crescimento celular, e em que o segundo gene cromossómico é um gene da célula hospedeira ou corresponde a um gene da célula hospedeira e é essencial para o crescimento celular.

4. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações anteriores em que o referido repressor é seleccionado do grupo consistindo em: o repressor lac de *E. coli*, o repressor de λ, o repressor trp de *E. coli*, o repressor galR de *E. coli*, o repressor araC de *E. coli*, o repressor tet de *E. coli* e o repressor ArgRNV de *E. coli*.

5. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações anteriores em que a referida célula hospedeira é uma célula animal tal como um célula de mamífero ou uma célula de insecto, uma célula vegetal, um fungo tal como uma levedura ou uma célula bacteriana.

6. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que a referida célula é uma célula bacteriana.

7. Célula de acordo com a reivindicação 6, em que a referida célula é uma célula bacteriana gram negativa.

8. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, sendo a referida célula *E. coli*.

9. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, sendo a referida célula *Salmonella*.

10. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, em que a referida célula é uma célula bacteriana gram positiva.

11. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10, sendo a referida célula *Bacillus*.

12. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, sendo a referida célula uma célula de levedura.

13. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, sendo a referida célula uma célula de mamífero.

14. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o referido plasmídeo compreende uma origem de replicação permitindo a replicação de cerca de 10-50 cópias do referido plasmídeo por célula hospedeira.

15. Célula hospedeira de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 13, em que o referido plasmídeo compreende uma origem de replicação permitindo a replicação de cerca de 100-200 cópias do referido plasmídeo por célula hospedeira.

16. Célula hospedeira num meio de cultura de acordo com a reivindicação 14, em que o referido plasmídeo é pBR322.

17. Célula hospedeira num meio de cultura de acordo com a reivindicação 15, em que o referido plasmídeo é pUC.

18. Célula hospedeira num meio de cultura de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o referido plasmídeo compreende um sítio de clonagem para inserção de um gene de interesse.

19. Célula hospedeira num meio de cultura de acordo com a reivindicação 18, compreendendo o referido plasmídeo um gene de interesse associado operacionalmente a sequências de controlo para expressão numa célula.

20. Célula hospedeira num meio de cultura de acordo com a reivindicação 19, em que o referido plasmídeo tem cerca de 1000 pb de comprimento.

21. Método de manutenção de um plasmídeo numa célula hospedeira, compreendendo o passo de cultivar a célula hospedeira num meio de cultura de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 20, durante um tempo e em condições suficientes para permitir que a referida célula hospedeira cresça.

22. Método de produção de ADN plasmídico, compreendendo cultivar a célula hospedeira num meio de cultura de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 20 durante um tempo e em condições suficientes para permitir que a referida célula cresça, e isolar o ADN plasmídico da referida célula hospedeira cultivada.

23. Método para produzir uma proteína recombinante compreendendo cultivar a célula hospedeira num meio de cultura de acordo com qualquer das reivindicações 19 a 20, durante um tempo e em condições suficientes para permitir que a referida célula hospedeira cresça, e isolar a

referida proteína recombinante da referida célula hospedeira cultivada.

Lisboa, 11 de Abril de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

FIG. 1

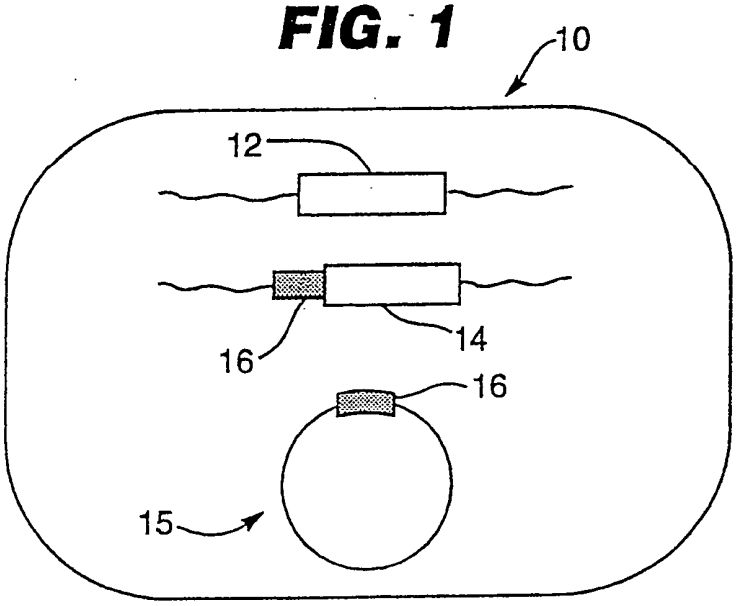


FIG. 2

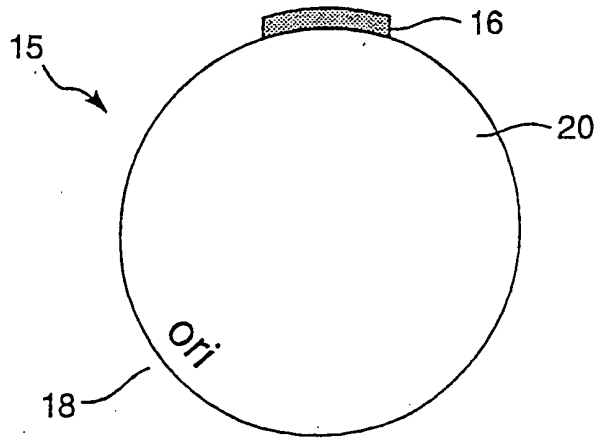


FIG. 3A

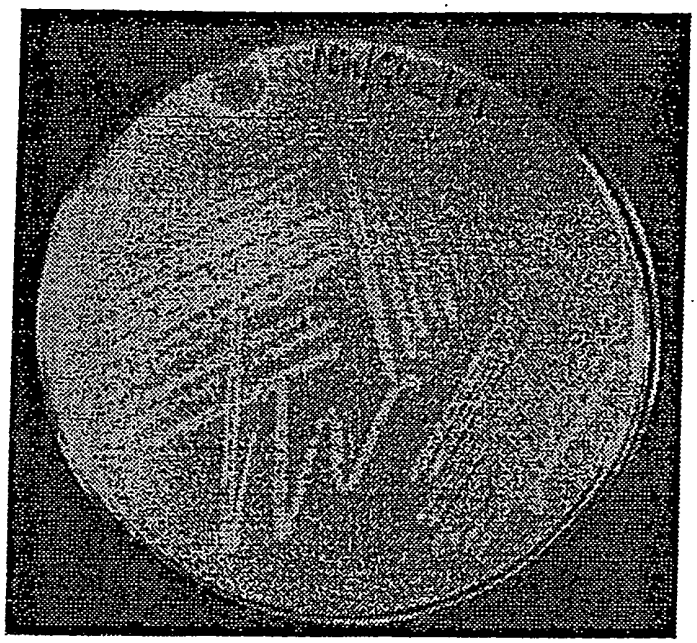


FIG. 3B

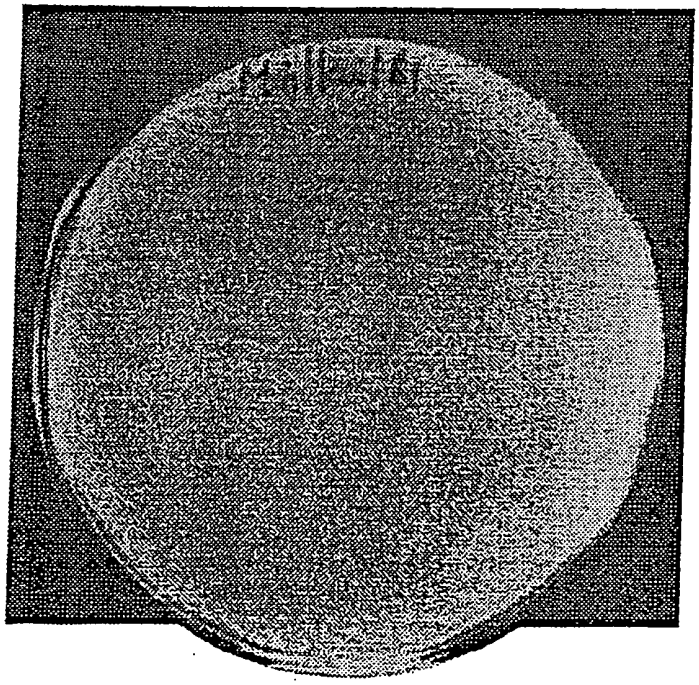


FIG. 3C

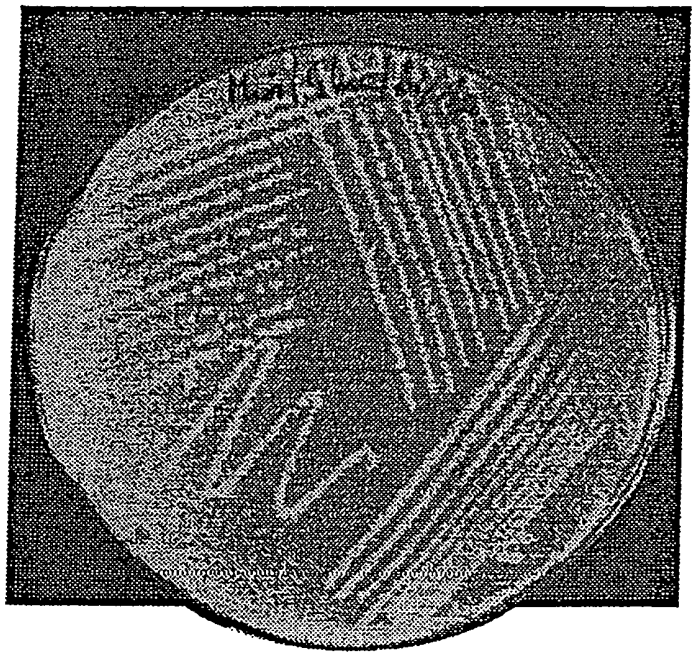
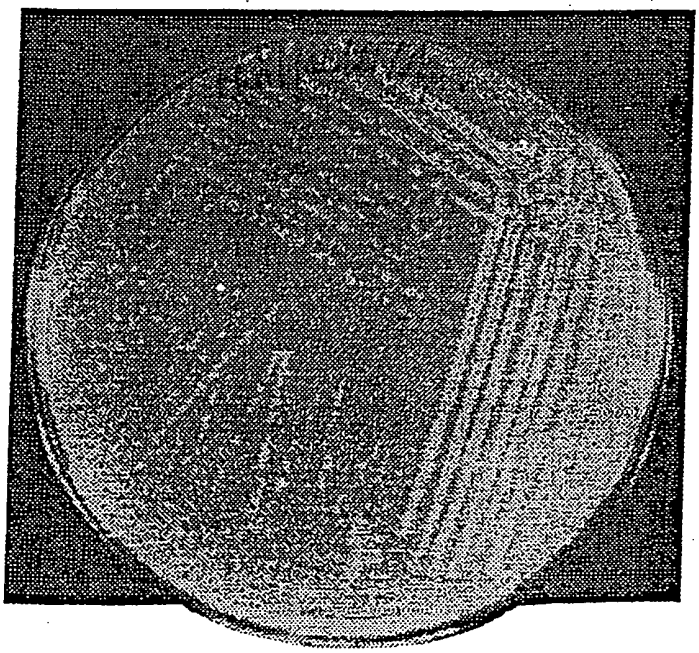


FIG. 3D



1 2 3 4 5 6

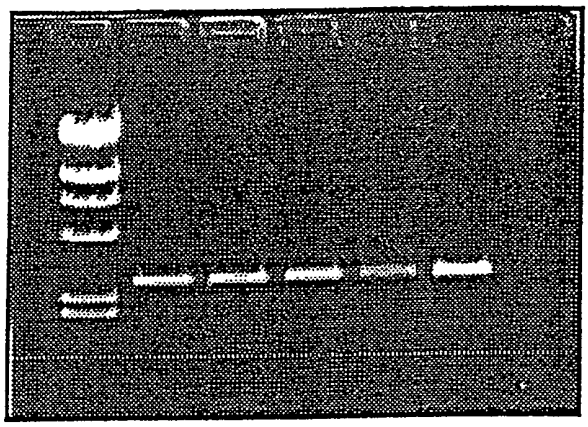


FIG. 4A

1 2 3 4 5 6

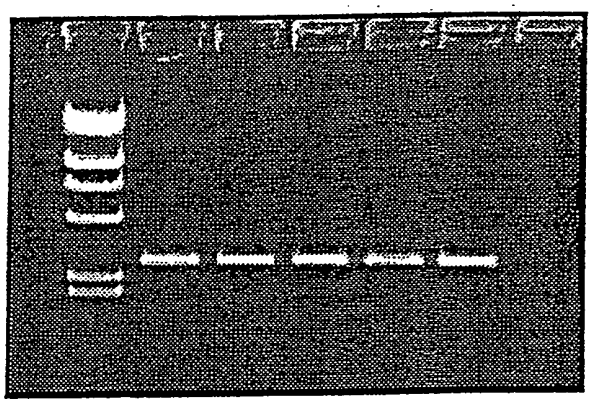


FIG. 4B

1 2 3 4 5 6

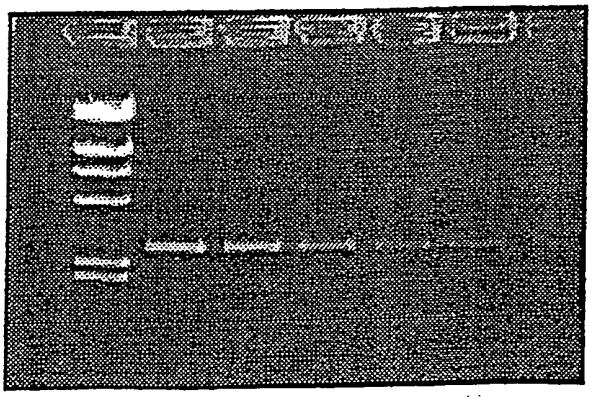


FIG. 4C

FIG.5

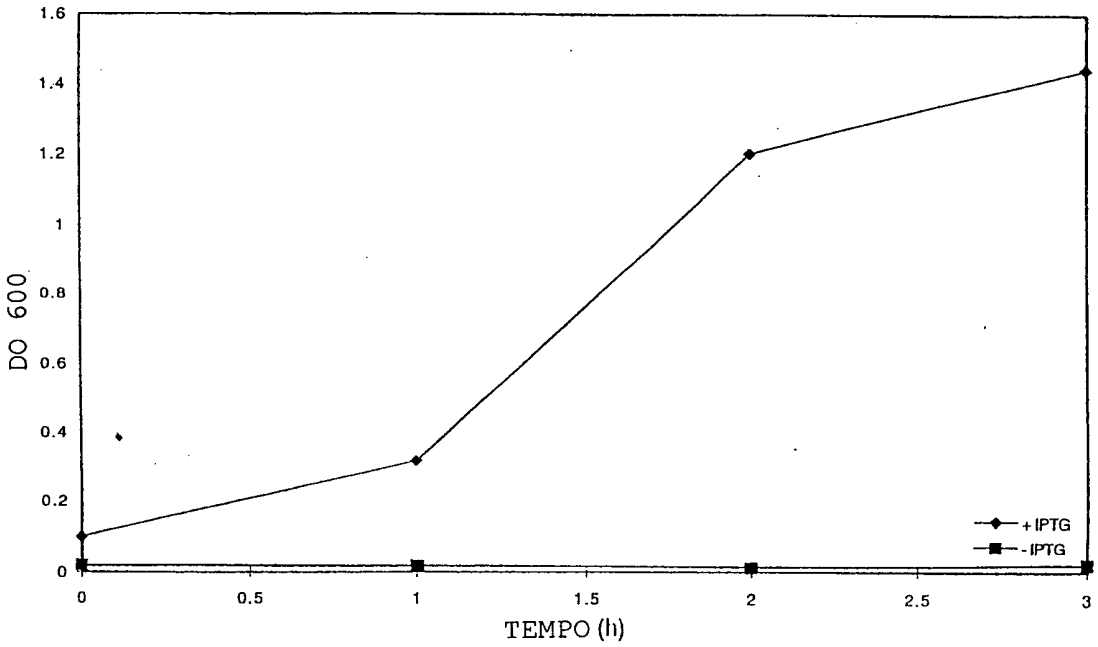


FIG.6

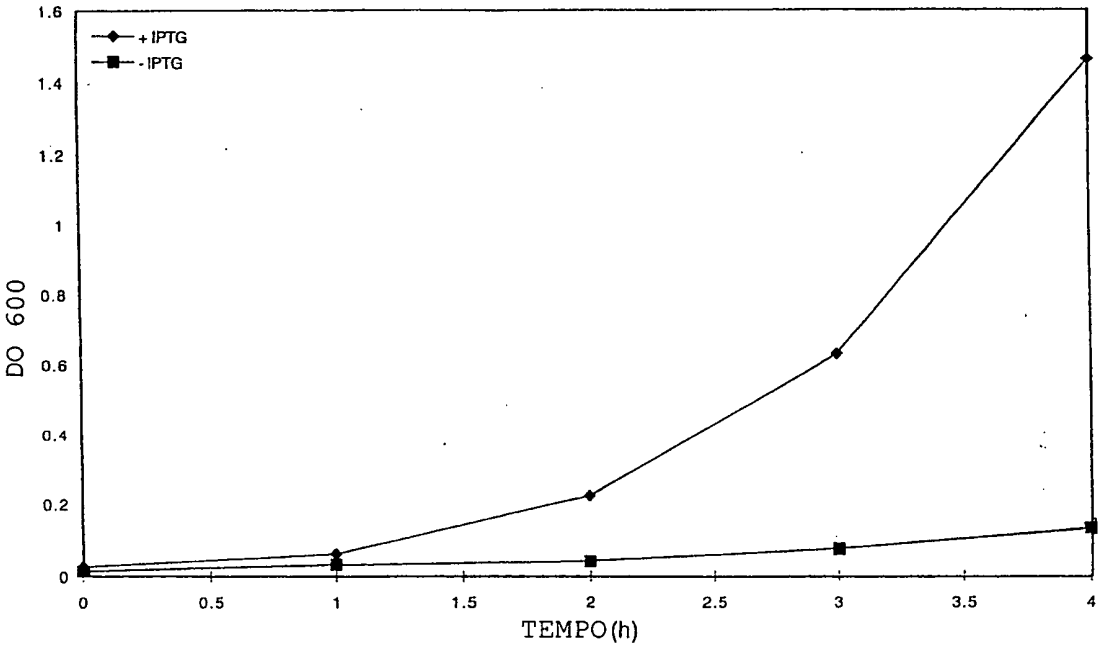


FIG.7

