

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO
Nº 93 135

NOME: THE SALK INSTITUTE BIOTECHNOLOGY/INDUSTRIAL ASSOCIATES,
INC.

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de superóxido-dismutase em
células de levedura de Pichia Pastoris"

INVENTORES: William Scot Craig, Gregory Clyde Holdz, Geneva
Ruth Davis

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

Estados Unidos da América em 13 de Fevereiro de 1989 sob o
nº 311.517.

70 618

48604

PATENTE Nº 93 135

"Processo de preparação de superóxido-
-dismutase em células de levedura de
Pichia Pastoris"

para que

THE SALK INSTITUTE BIOTECHNOLOGY/IN-
DUSTRIAL ASSOCIATES, INC., pretende
obter privilégio de invenção em Portu-
gal

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação da enzima superóxido-dismutase e particularmente da superóxido-dismutase humana, por cultura de P.pastoris transformada para exprimir a enzima.

MEMÓRIA DESCRITIVACampo da Invenção

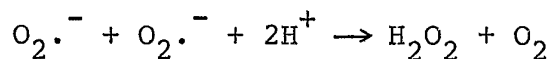
O presente invento refere-se, geralmente, a avanços na biologia molecular e na tecnologia de ADN recombinante.

Mais particularmente, o presente invento é dirigido a um processo de tecnologia de ADN recombinante para a produção de polipéptidos com actividade de superóxido-dismutase (aqui depois também designada por SOD) em células de levedura de Pichia pastoris. Os transformantes de Pichia pastoris contendo no seu genoma pelo menos uma cópia de uma sequência de ADN codificando operativamente o polipéptido desejado sob a regulação de uma região promotora de um gene de P. pastoris, são cultivados sob condições que permitem a expressão do produto do gene SOD. A invenção refere-se também a transformantes de P. pastoris, a fragmentos de ADN e a vectores de expressão, usados para a sua produção e a culturas contendo os referidos transformantes.

Antecedentes da Invenção

Uma variedade de processos normais e patológicos em células aeróbias conduzem à produção de radicais livres danificadores dos tecidos. Crê-se que o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), em muitos casos gerado pela enzima xantina-oxidase, é o mediador principal destes danos, que podem ocorrer, por exemplo, quando o tecido é reperfundido após um transplante de um órgão ou após a remoção dum coágulo sanguíneo. O radical superóxido tem também sido implicado na resposta inflamatória de fagócitos. A evidência para este envolvimento é derivada da observação de que, uma família de enzimas capazes de destruir o superóxido (superóxido-dismutases), pode reduzir substancialmente os danos de superfusão e possui propriedades anti-inflamatórias.

As superóxido-dismutases são enzimas que têm, quer Cu(II) e Zn(II), quer Mn(II) sózinho ou Fe(II) sózinho, no sítio activo para catalisar a reacção.



A primeira proteína que se verificou, em 1969, possuir atividade de superóxido-dismutase [McCord et al., J. Biol. Chem. **244**, 6049 (1969)] foi isolada a partir de eritrócitos em 1939 e foi designada por eritrocupreína. Desde então os genes de vários membros da família têm sido clonados [Sherman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 5465 (1983); Hallewell et al., Nucleic Acids Res. **13**, 2017 (1985); Beck et al., Nucleic Acids Res. **15**, 9076 (1987)] e a estrutura cristalográfica de raios X foi determinada para a enzima Cu/Zn bovina [Richardson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 1349 (1975)]. A sequência de aminoácidos da superóxido-dismutase humana (hSOD), uma enzima Cu/Zn citoplásmica eucariótica, está descrita em Jabusch et al., Biochemistry **19**, 2310 (1980). De acordo com esta referência, a hSOD é um dímero não covalente de subunidades idênticas, cada uma contendo 153 aminoácidos. O terminal amino da cadeia polipeptídica está acetilado. Na Figura 1, mostram-se a sequência de ácidos nucleicos e a sequência de aminoácidos prevista, do monômero hSOD, tal como foram descritas na Publicação do Pedido de Patente Europeia nº 233 244. As sequências descritas na literatura podem mostrar várias diferenças de nucleótidos, mas isto não parece ter qualquer efeito na estrutura global e nas propriedades da hSOD.

Uma comparação da sequência de aminoácidos, deduzida da superóxido-dismutase extracelular humana madura (EC-SOD) com as da SOD Cu/Zn do Homem, do porco, da vaca, do cavalo, do espadarte, da mosca da fruta, do espinafre da S. cerevisiae, e da P. leiognathi, é apresentada por Hjalmarsson et al., em Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6340 (1987).

A capacidade das superóxido-dismutases em catalisarem a destruição de radicais superóxido torna-as úteis numa variedade de aplicações terapêuticas. A SOD de bovino é normalmente comercializada na forma de uma composição farmacêutica humana anti-inflamatória ou na forma de um produto veterinário, particularmente para o tratamento de tendões inflamados de cavalos. As aplicações farmacêu-

ticas potenciais são ainda mais numerosas. Nos esforços para explorar o potencial terapêutico total das superóxido-dismutases pode ser vantajoso usar a enzima hSOD para terapêuticas humanas de modo a eliminar as repostas imunológicas adversas possíveis com a enzima bovina antigenicamente distinta.

Ambas as aplicações humanas e veterinárias das superóxido-dismutases requerem grandes quantidades destes materiais que apenas podem ser produzidas por tecnologia de ADN recombinante.

A expressão hSOD Cu/Zn em E. coli sob regulação do promotor tacI foi referida por Hallewell et al., Nucleic Acids Res. 13, 2017 (1985). No polipéptido expresso em E. coli, a metionina N-terminal é removida e, ao contrário do que acontece na hSOD autêntica, o grupo alanina N-terminal não está acetilado. Dos 500 clones examinados, apenas cerca de 25 sintetizavam 5% ou mais de proteína de célula solúvel como SOD. Numa experiência que parece ser o seu melhor, cerca de 15% da proteína de célula solúvel foi identificada como SOD. A ausência de acetilação N-terminal é desvantajosa. Quando a forma natural de um polipéptido, como é o caso da hSOD, está N-acetilada, para uso terapêutico ou de diagnóstico preferem-se os produtos recombinantes autênticos. i.e., N-acetilados. Deste modo pode-se eliminar ou, pelo menos, minimizar a imunogenicidade quando o produto recombinante é administrado a um hospedeiro humano ou animal. Os polipéptidos acetilados são também, usualmente, mais estáveis e resistentes à degradação por proteases.

As leveduras parecem ser boas alternativas como hospedeiros, para a produção de superóxido-dismutases, por um certo número de razões. No caso de proteínas heterólogas eucarióticas, p.e., SOD, as leveduras podem oferecer claras vantagens em relação às bactérias. O ambiente intracelular das leveduras, sendo elas próprias eucarióticas, é mais provavelmente conducente à dobragem adequada da molécula. Adicionalmente, as leveduras podem ser geralmente cultivadas até densidades de células mais elevadas do que as bactérias. Além disso, o iniciador metionina é muitas vezes processado por leveduras; isto não é observado muitas vezes em bactérias.

A produção de hSOD em S. cerevisiae (levedura de Baker) é descrita no Pedido de Patente Europeia nº 84111416.8, publicado em 24 de Abril de 1985 com o nº 0138111. Em experiências à escala laboratorial exprimiui-se a hSOD Cu/Zn numa quantidade da ordem de cerca de 10 a 30% da proteína de célula total, na forma autêntica N-acetilada.

Usando a estirpe 2150-2-3 leu⁻ de Saccharomyces cerevisiae Hallewell et al., Bio/Technology 5, 363 (1987) (inventores do pedido de patente anteriormente identificado) descrevem a produção de uma forma autêntica, N-acetilada de hSOD Cu/Zn. Ainda que, de acordo com o artigo, a hSOD tenha sido expressa "com níveis muito elevados" sob a regulação do promotor de gliceraldeído-fosfato-desidrogenase de levedura, os autores não apresentam quaisquer resultados quantitativos em relação aos níveis de expressão. Além disso, os autores não apresentam resultados mostrando que é apenas a hSOD, e a hSOD quente em combinação com SOD, de levedura, que constituem o nível de expressão. Refere-se que os níveis de hSOD estão compreendidos entre 30% e 70% da proteína de célula total em levedura em fase estacionária. Os seus resultados em células em cultura exponencial foram consideravelmente piores de modo que, ocasionalmente, não se detectou hSOD durante o crescimento exponencial. Isto indica que a cultura de células até à fase estacionária é uma necessidade para obter níveis de expressão razoáveis. Este facto, por sua vez resulta num procedimento de fermentação muito prolongada sem qualquer hipótese prática de se conseguir um modo contínuo.

Se bem que a S. cerevisiae seja provavelmente a levedura mais exhaustivamente investigada, é, usualmente, um candidato imperfeito para a produção de proteínas estranhas. Em muitos casos têm-se encontrado problemas nas tentativas para passar da escala laboratorial para uma escala comercialmente útil. Uma origem deste problema resulta do facto de os promotores disponíveis para expressão em S. cerevisiae serem relativamente fracos e não estarem bem regulados. Como resultado, as construções de expressão têm normalmente de ser colocadas em plasmídeos multi-cópia para se obter um nível de expressão aceitável. Isto é verdade para a produção de

hSOD em S. cerevisiae tal como é descrito por Hallewell et al., supra. Em fermentadores operando a uma densidade de células elevada, perde-se a selecção da manutenção do plasmídeo e, a distribuição, número de cópia e estabilidade do plasmídeo tornam-se um problema.

Para ultrapassar estes e outros problemas associados com a S. cerevisiae, desenvolveu-se um sistema de expressão em levedura baseado na Pichia pastoris. A P. pastoris é uma levedura metilotrófica; tem percursos metabólicos que respondem a, e que regulam a utilização de metanol. Uma enzima chave no percurso do metanol é a álcool-oxidase, uma proteína codificada por dois genes, álcool-oxidase I (AOX1) e a álcool-oxidase II (AOX2). Quando se cultivam células de P. pastoris na presença de metanol, os genes AOX1 e AOX2 são transcritos e fabrica-se uma grande quantidade de proteína álcool-oxidase. O nível elevado de expressão do gene AOX é principalmente devido ao promotor do gene AOX1, que é activado na presença de metanol e que se exprime com níveis elevados e é regulado rigorosamente (p.e., ver Pedido de Patente Europeia nº 85113737.2 publicado em 30 de Outubro de 1984, com o nº 183071). Uma descrição mais completa de um sistema de expressão de P. pastoris que responde ao metanol, e que coloca genes heterólogos sob a regulação do promotor de AOX1 de P. pastoris, pode ser encontrada em Cregg et al., Bio/Technology 5, 479 (1987).

Ainda que a P. pastoris tenha sido usada com sucesso para a produção de várias proteínas heterólogas, p.e., o antigénio de superfície da hepatite B (AgSHB) (Cregg et al., supra) ou o factor de necrose de tumor, as tentativas para produzir outros produtos de genes heterólogos em Pichia têm dado resultados mistos. No presente estado de compreensão do sistema de expressão de P. pastoris é imprevisível se um dado gene pode ser expresso nesta levedura, se os níveis de expressão serão satisfatórios, ou se a Pichia tolerará a presença do produto do gene recombinante nas suas células.

Sumário da Invenção

O presente invento é baseado na utilização do sistema de

expressão da P. pastoris para a produção por tecnologia de ADN recombinante de polipéptidos com actividade de SOD. O processo de acordo com a invenção é muito eficiente, produzindo SOD, em particular hSOD, com níveis surpreendentemente elevados, e pode ser facilmente ampliado de culturas em balão agitado até grandes fermentadores sem modificações consideráveis nas condições de fermentação ou perdas em eficácia. Uma vez que as estirpes de dupla-cópia proporcionam níveis de expressão consideravelmente mais elevados do que as estirpes que tem integrada apenas uma única cópia da "cassette" de expressão no seu genoma, o sistema de expressão de acordo com a invenção tem grandes potenciais em aumentar os níveis de expressão ainda mais pela introdução de cópias adicionais da "cassette" de expressão no genoma de levedura.

A Pichia pastoris é uma estirpe de levedura industrial conhecida que é capaz de utilizar o metanol como a única fonte de carbono e energia. De acordo com as experiências dos requerentes, podem-se produzir eficazmente polipéptidos com actividade de SOD, por exemplo, SOD humana (hSOD) por integração de pelo menos uma cópia de uma "cassette" de expressão contendo uma sequência de ADN codificando o polipéptido SOD desejado, sob a regulação de uma região promotora de um gene de P. pastoris, no genoma da estirpe de hospedeiro.

Para a substituição do gene, insere-se um fragmento de ADN linear, contendo pelo menos uma cópia da "cassette" de expressão, num local desejado, por exemplo, no local AOX1 onde substitui o gene endógeno. Se o gene AOX1 é quebrado devido à inserção da unidade de expressão, o gene AOX2 ainda funcional fornece álcool-oxidase suficiente para o crescimento lento em metanol. Estas estirpes são designadas por deficientes na utilização de metanol, Mut⁻.

Nas estirpes desenvolvidas usando a técnica de adição de gene, adiciona-se a "cassette" de expressão, contida no plasmídeo transformante, ao local desejado, p.e., no local AOX1 ou HIS4, sem ruptura do gene endógeno. Estas estirpes são designadas por Mut⁺ e mostram o crescimento do tipo selvagem em metanol.

A integração estável foi conseguida tanto por substituição do gene como por adição do plasmídeo. Em qualquer dos casos, o desenvolvimento de transformantes pelo uso de vectores de integração, em oposição aos baseados em plasmídeos autónomos (tal como no caso da S. cerevisiae), resulta em estirpes recombinantes mais produtoras.

Na produção de polipéptidos SOD, ambas as estirpes Mut⁻ e Mut⁺ tiveram um bom desempenho mas verificou-se que a estirpe Mut⁺ era superior. A estirpe Mut⁺, contendo duas cópias integradas da "cassette" de expressão da SOD no seu genoma, produziu hSOD numa concentração pelo menos três vezes mais elevada, do que a concentração, também invulgarmente elevada, produzida pelas estirpes de cópia única.

O presente invento refere-se a uma célula de P. pastoris contendo no seu genoma pelo menos uma cópia de uma sequência de ADN codificando operativamente na P. pastoris um polipéptido com actividade de SOD sob a regulação de uma região promotora de um gene da P. pastoris.

De acordo com um seu outro aspecto, o presente invento refere-se a fragmentos de ADN compreendendo, no sentido da transcrição, uma região promotora de um primeiro gene da P. pastoris, uma sequência codificando operativamente na P. pastoris um polipéptido com actividade de SOD e um segmento de terminação da transcrição de um segundo gene da P. pastoris, os referidos primeiro e segundo genes da P. pastoris sendo idênticos ou diferentes. O fragmento de ADN de acordo com a invenção pode compreender, adicionalmente, um gene marcador seleccionável, e terminais com homologia suficiente com um gene alvo para efectuarem aí a integração do referido fragmento de ADN. Alternativamente, os fragmentos de ADN podem estar contidos em, ou podem ser, plasmídeos circulares, que podem ser linearizados e que se integrarão num sítio de homologia entre o hospedeiro e o plasmídeo.

O presente invento refere-se ainda a um processo para a produção de um polipéptido com actividade de SOD, compreendendo a

cultura de transformantes de P. pastoris contendo no seu genoma pelo menos uma cópia de uma sequência de ADN, codificando operativamente na P. pastoris um polipéptido com actividade de superóxido-dismutase sob a regulação de uma região promotora de um gene da P. pastoris sob condições que permitem a expressão da referida sequência de ADN na referida estirpe de P. pastoris.

Os polipéptidos com actividade de SOD são produzidos de acordo com a invenção numa forma autêntica, adequadamente dobrada, têm a dimensão e a carga superficial correcta. Os polipéptidos obtidos são totalmente funcionais resultando a actividade específica esperada.

O presente invento dirige-se aos aspectos anteriores e a todos os processos associados e a meios para os realizar. Por exemplo, a invenção inclui a tecnologia requerida para o crescimento adequado das células hospedeiras de P. pastoris, fermentação e extracção do produto do gene, o polipéptido SOD. O invento inclui, adicionalmente, processos e meios para a remoção ou inactivação do gene da SOD endógena da P. pastoris. A substituição deste gene por uma sequência de ADN codificando a SOD humana, sob o controlo de uma região promotora do gene da SOD endógena da P. pastoris, aumenta adicionalmente os níveis de produção, e permite obter hSOD com uma pureza elevada, sem qualquer SOD endógena de Pichia. A ruptura do gene e a substituição pode ser realizada por quaisquer métodos conhecidos na arte.

A P. pastoris é descrita como um sistema modelo do uso protegido de um hospedeiro de levedura metilotrófica, principalmente devido às suas características de expressão únicas. Outras leveduras metilotróficas úteis podem ser escolhidas de entre quatro géneros nomeadamente, Candida, Hanensula, Pichia e Torulopsis. Como hospedeiros podem-se usar aqui espécies equivalentes principalmente com base na sua caracterização demonstrada de serem suportáveis, em relação ao crescimento e exploração, em metanol como única fonte nutriente de carbono. Ver, por exemplo, Gleeson et al., Yeast 4, 1 (1988).

Breve Descrição dos Desenhos

Na Figura 1, mostra-se a sequência de ácidos nucleicos e a sequência de aminoácidos prevista da hSOD.

Na Figura 2, apresentam-se os resultados de certas experiências de fermentação de hSOD.

Na Figura 3, ilustram-se ensaios da superóxido-dismutase.

Descrição Detalhada da Invenção

1. Definições e Métodos gerais

O presente invento proporciona um sistema de expressão adequado para a produção de polipéptidos com actividade de SOD.

O termo "polipéptido com actividade de SOD" é usado para abranger os polipéptidos de qualquer origem, incluindo plantas, animais, tais como mamíferos, incluindo o Homem, os seus análogos e fragmentos exibindo actividade de superóxido-dismutase. Por exemplo, os polipéptidos em que a um ou a ambos os monómeros, cuja sequência de aminoácidos se ilustra na Figura 1 do presente invento, ou na Figura 2 do artigo de Hjalmarson et al., supra, faltam um ou mais aminoácidos, ou os polipéptidos contendo aminoácidos adicionais, ou os polipéptidos nos quais um ou mais aminoácidos, nas sequências de aminoácidos ilustradas, estão substituídos por outros aminoácidos, são abrangidos pelo âmbito da invenção, desde que exibam actividade semelhante à da SOD. O termo é usado para incluir construções diméricas contendo duas subunidades idênticas (homodímeros), bem como os dímeros consistindo de duas subunidades diferentes (heterodímeros).

O termo "actividade de SOD" e as suas variações gramaticais, tal como são usados através da descrição e nas reivindicações, referem-se à actividade exibida pelas superóxido-dismutases isoladas da fonte natural em bioensaios reconhecidos na arte, tais como os ensaios espectrofotométricos e os ensaios de actividade electroforética.

Uma vez que o substrato da SOD é o anião superóxido, que é um radical livre instável, não existe qualquer método conveniente para detectar directamente a actividade da enzima. A literatura descreve vários ensaios indirectos que seguem a evolução da concentração, em estado estacionário do superóxido à medida que ele passa electrões para um composto indicador. A actividade da superóxido-dismutase é medida pelo seu efeito como competidor para o substrato, o superóxido. Estes ensaios indirectos têm de incluir um método para a geração e detecção do superóxido. A geração do superóxido pode ser realizada enzimaticamente, p.e., com xantina-oxidase e xantina, ou fotoquimicamente, p.e., com riboflavina e tetrametiletilenodiamina (TEMED). Alternativamente, o superóxido pode ser detectado com aceptadores de electrões tais como o ferricitocromo c, o azul de tetrazólio (NBT), ou por oxidação com hidroxilamina.

O ensaio espectrofotométrico padrão para a detecção de SOD usa a xantina-oxidase, actuando na xantina e um oxigénio molecular para gerar o superóxido, e a velocidade de redução do citocromo c para o detectar. Uma vez que o superóxido não pode ser gerado em quantidades suficientes para saturar a enzima, os métodos clássicos para calcular a quantidade de enzima não são úteis. Em vez disso, define-se uma unidade de actividade como sendo a quantidade que provoca uma inibição de 50% da redução do citocromo c sob condições específicas [McCord et al., J. Biol. Chem. 244, 6049 (1969)].

Um método superior para a medição da actividade de SOD é um ensaio de ponto final que é baseado na oxidação da hidroxilamina a nitrito, que é por sua vez detectado com um corante indicador [Elstner et al., Anal. Biochem. 70, 616 (1976)].

Alternativamente, as actividades de SOD endógenas e heterólogas podem ser separadas e testadas em P. pastoris num gel de acrilamida após electroforese não desnaturante. Para este ensaio o gerador e o detector de superóxido mais convenientes são, respectivamente, a riboflavina/TEMED e o azul de tetrazólio (NBT) [Beauchamp et al., Anal Biochem. 44, 276-287 (1971)].

Ainda que seja por vezes difícil reproduzir exactamente as condições de teste, pelo que deste modo os resultados de publicações diferentes podem variar, os polipéptidos exibindo o mesmo tipo de actividade que as superóxido-dismutases naturais, em qualquer um dos ensaios anteriores ou em outros ensaios conhecidos na arte, são todos incluídos no âmbito do presente invento.

Os aminoácidos que ocorrem nas várias sequências de aminoácidos referidas na descrição são designados pelas suas abreviaturas usuais, de três e uma letra, normalmente utilizadas na arte, i.e.:

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviatura</u>	
L-Alanina	Ala	A
L-Arginina	Arg	R
L-Asparagina	Asn	N
Ácido L-aspártico	Asp	D
L-Cisteína	Cys	C
L-Glutamina	Gln	Q
Ácido L-glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
L-Histidina	His	H
L-Isoleucina	Ile	I
L-Leucina	Leu	L
L-Lisina	Lys	K
L-Metionina	Met	M
L-Fenilalanina	Phe	F
L-Prolina	Pro	P
L-Serina	Ser	S
L-Treonina	Thr	T
L-Triptofano	Trp	W
L-Tirosina	Tyr	Y
L-Valina	Val	V

De acordo com a invenção, os polipéptidos com actividade de SOD são produzidos por células de levedura de P. pastoris contem-

do nos seus genomas, pelo menos, uma cópia de uma sequência de ADN codificando operativamente, na P. pastoris, um polipéptido com actividade de SOD sob a regulação de uma região promotora de um gene da P. pastoris. A sequência de ADN codificando a SOD é um gene codificando a SOD, seus análogos e fragmentos, tal como foram aqui anteriormente definidos. O gene pode ser obtido por técnicas de síntese química conhecidas, agora possíveis uma vez que a sequência foi publicada e está assim disponível, ou por transcrição de um ARN mensageiro (ARNm) correspondente à SOD, num ADN complementar (ADNc) e conversão do ADNc de cadeia simples obtido num ADNc de cadeia dupla. O ARNm pode ser separado de qualquer célula de mamífero capaz de produzir polipéptidos com actividade SOD, tal como as células de fígado de humano adulto.

A sequência de ADN requerida pode também ser removida, por exemplo, por digestão, com enzimas de restrição, de vectores conhecidos compreendendo o gene. Exemplos destes vectores e de meios para a sua preparação podem ser encontrados nos documentos publicados seguintes: Hallewell et al., (1985) supra (plasmídeos ptao5SOD), Pedido de Patente Europeia nº 88104880.5, publicado em 28 de Setembro de 1988, com o número 0284105 (plasmídeo de expressão da super-óxido-dismutase de manganês humana, pMSE-4, e plasmídeos relacionados), Pedido de Patente Europeia nº 84111416.8, publicado em 24 de Abril de 1985 com o nº 0138111 (plasmídeos pCl/1GAPSOD e pCl/1GALAPSOD), etc.

A região promotora utilizada para conduzir a expressão do gene da SOD é derivada de um gene da álcool-oxidase, regulado por metanol, da P. pastoris. Tal como aqui anteriormente se descreveu, é conhecido que a P. pastoris contém dois genes funcionais de álcool-oxidase: os genes álcool-oxidase I (AOX1) e álcool-oxidase II (AOX2). As porções de codificação dos dois genes AOX são muito homólogas, ao nível da sequência de ADN e da sequência de aminoácidos prevista, e partilham sítios de restrição comuns. As proteínas expressas pelos dois genes têm propriedades enzimáticas similares mas o promotor do gene AOX1 exprime-se de um modo mais eficiente e com níveis mais elevados, e, deste modo, prefere-se o seu uso para

a expressão da SOD. O gene AOX1, incluindo o seu promotor, foi isolado e exhaustivamente caracterizado por [Ellis et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1111 (1985)]7.

Uma "cassette" de expressão, incluindo o ADN codificando a SOD conjuntamente com a região promotora e um segmento de terminação da transcrição, é inserido no genoma do hospedeiro por meio de um fragmento de ADN linear ou de um plasmídeo circular ou linearizado contendo o referido fragmento de ADN. O segmento de terminação da transcrição é um fragmento de ADN de um gene codificando a proteína de P. pastoris, incluindo, um subsegmento que codifica um sinal de poliadenilação e um sítio de poliadenilação no transcrito do promotor usado na "cassette" de expressão, e um outro subsegmento que proporciona um sinal de terminação da transcrição para a transcrição desse promotor. O segmento de terminação da transcrição pode ser derivado do mesmo gene ou de um gene de P. pastoris diferente do usado como fonte da região promotora.

O termo "cassette de expressão" tal como é aqui usado e através da descrição e nas reivindicações refere-se a uma sequência de ADN que inclui sequências funcionais para a expressão.

Os fragmentos de ADN de acordo com a invenção podem compreender adicionalmente um gene marcador seleccionável. Para este propósito, pode usar-se qualquer gene marcador seleccionável, funcional em P. pastoris, i.e., qualquer gene que confira um fenótipo às células de P. pastoris de modo a permitir que elas sejam identificadas e cresçam selectivamente de entre uma grande maioria de células não transformadas. Genes marcadores seleccionáveis adequados incluem, por exemplo, sistemas marcadores seleccionáveis compostos de uma estirpe hospedeira de P. pastoris mutante auxotrófica e de um gene biossintético do tipo selvagem que complementa o defeito do hospedeiro. Para a transformação das estirpes de P. pastoris his4⁻, por exemplo, pode-se usar o gene HIS4 de S. cerevisiae ou de P. pastoris, ou para a transformação de mutantes arg4⁻, pode-se usar o gene ARG4 de S. cerevisiae ou o gene ARG4 de P. pastoris.

Se o hospedeiro de levedura é transformado com fragmento

de ADN linear contendo o gene SOD sob a regulação de uma região promotora de um gene da P. pastoris, a "cassette" de expressão é integrada no genoma do hospedeiro por qualquer das técnicas de substituição de gene conhecidas na arte, tal como o método de substituição de gene num passo [ver, p.e., Rothstein, Methods Enzymol. 101, 202 (1983); Cregg et al., Bio/Technology 5, 479 (1987)] ou o método de substituição de gene em dois passos [ver, p.e., Scherer and Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4951 (1979)]. O fragmento de ADN linear é dirigido a um local desejado, i.e., ao gene alvo a ser quebrado por sequências de ADN de flanqueamento com homologia suficiente com o gene alvo para aí efectuar a integração do fragmento de ADN. As quebras de gene num só passo são usualmente bem sucedidas se o ADN a ser introduzido tem uma homologia tão pequena quanto 0,2 kb com o local do fragmento do gene alvo; é contudo preferível maximizar o grau de homologia para se ter uma melhor eficiência.

Se o fragmento de ADN de acordo com a invenção está contido num vector de expressão ou é um vector de expressão, p.e., um plasmídeo circular, podem integrar-se uma ou mais cópias do plasmídeo, no mesmo ou em locais diferentes, por adição. A linearização do plasmídeo com uma endonuclease de restrição adequada facilita a integração.

O termo "vector de expressão" inclui vectores capazes de exprimirem sequências de ADN neles contidas, quando essas sequências estão em associação operacional com outras sequências capazes de efectuar a sua expressão, i.e., sequências promotoras. De um modo geral, os vectores de expressão usualmente utilizados em tecnologia de ADN recombinante estão muitas vezes na forma de "plasmídeos", i.e., moléculas de ADN de cadeia dupla, circulares que, na sua forma de vector não estão ligadas ao cromossoma. Na presente descrição, os termos "vector" e "plasmídeo" são usados intermutavelmente. Contudo, pretendem-se incluir também na invenção outras formas de vectores de expressão que funcionem de um modo equivalente.

Nos fragmentos de ADN de acordo com a invenção, os segmen-

tos da "cassette" de expressão estão em "associação operacional". A sequência de ADN codificando polipéptidos com actividade de SOD estão posicionadas e orientadas funcionalmente em relação ao promotor e ao terminador de transcrição, de modo a que o segmento codificando o polipéptido seja transcrito, sob a regulação da região promotora, num transcrito capaz de proporcionar a tradução do polipéptido desejado na P. pastoris. O posicionamento e a orientação da cadeia de leitura apropriados dos vários segmentos da "cassette" de expressão são conhecidos dos peritos na arte; nos Exemplos apresentam-se outros detalhes.

Os fragmentos de ADN proporcionados pelo presente invento, podem incluir sequências permitindo a sua replicação e selecção em bactérias, especialmente em E. coli. Deste modo podem produzir-se, por replicação em bactérias, grandes quantidades do fragmento de ADN.

Os métodos para transformar Pichia pastoris bem como os métodos aplicáveis para a cultura de células de P. pastoris contendo, no seu genoma, um gene para uma proteína heteróloga são geralmente conhecidos na arte.

De acordo com a invenção, as "cassettes" de expressão são transformadas nas células de P. pastoris, quer pela técnica dos esferoplastos, descrita por Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985) quer pelo sistema de transformação de levedura de cloreto de lítio de células inteiras [Ito et al., Agric. Biol. Chem. 48, 341 (1984)], com pequenas modificações para adaptação à P. pastoris. Ainda que o método do cloreto de lítio de células inteiras seja mais conveniente em virtude de não requerer a geração e a manutenção de esferoplastos, para os propósitos do presente invento prefere-se o método dos esferoplastos, principalmente devido ao facto de com ele se obter um maior número de transformantes.

Os transformantes positivos são caracterizados por análise de mancha Southern [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, EUA (1982)] para determinar o local da integração do

ADN e o número de integrantes, e por mancha de Northern /Maniatis, Op. Cit., R.S. Zitomer e B. D. Hall, J. Biol. Chem, 251, 6320 (1976)] para avaliar a transcrição do gene da SOD que responde ao metanol.

As estirpes transformadas que têm o fenótipo e o genótipo desejado são cultivadas em fermentadores. Para a produção em grande escala de produtos, baseados em ADN recombinante, na P. pastoris, usa-se normalmente um sistema de fermentação descontínuo, com uma densidade de células elevada, em duas etapas. Na primeira etapa, ou etapa de crescimento, cultivam-se os hospedeiros de expressão em meio mínimo definido com glicerol como fonte de carbono. Nesta fonte de carbono, a expressão do gene heterólogo é completamente reprimida, o que permite a geração de massa celular na ausência de expressão da proteína heteróloga. Após a eliminação desta fonte de carbono repressora, adiciona-se metanol, iniciando-se a expressão da proteína heteróloga desejada. Esta segunda etapa é designada por etapa de produção.

O termo "cultura" refere-se à propagação de células num meio conducente ao seu crescimento, e a todas as suas sub-culturas. O termo "sub-cultura" refere-se a uma cultura de células cultivadas a partir de outra cultura (cultura de fonte), ou a qualquer sub-cultura da cultura de fonte, independentemente do número de sub-culturas que foram realizadas entre a sub-cultura de interesse e a cultura de fonte.

Nas experiências de fermentação utilizaram-se os componentes principais do meio de cultura seguintes:

A. SAIS DE BASE 10X

<u>Produtos Químicos</u>	<u>Gramas/litro</u>
Ácido fosfórico, 85%	42,0 ml
Sulfato de cálcio.2H ₂ O	1,8
Sulfato de potássio	28,6
Sulfato de magnésio.7H ₂ O	23,4
Hidróxido de potássio	6,5

B. SOLUÇÃO DE SAIS VESTIGIAIS IM₁

<u>Produtos Químicos</u>	<u>Gramas/litro</u>
Sulfato cúprico.5H ₂ O	0,06
Iodeto de potássio	0,08
Sulfato de manganês.H ₂ O	0,30
Molibdato de sódio	0,20
Ácido bórico	0,02
Sulfato de zinco.H ₂ O	2,00
Cloreto férrico.H ₂ O	4,8
Ácido sulfúrico	5,00 ml/litro

C. SOLUÇÃO VESTIGIAIS YTM₄ + BIOTINA

<u>Produtos Químicos</u>	<u>Gramas/litro</u>
Sulfato ferroso.7H ₂ O	65,0
Sulfato de cobre.5H ₂ O	6,0
Sulfato de zinco.7H ₂ O	20,0
Sulfato de manganês.H ₂ O	3,0
Ácido sulfúrico	5,0 ml
Biotina	0,1

2. Descrição da Concretização Preferida

De acordo com uma concretização preferida da invenção, o sistema de expressão da proteína heteróloga, usado para a produção de polipéptidos com actividade de SOD, utiliza o promotor derivado do gene AOX1, regulado por metanol, da P. pastoris que é muito eficientemente expresso e rigorosamente regulado. Este gene é também a fonte do segmento de terminação da transcrição.

As células hospedeiras a ser transformadas com a "cassette" de expressão são células de P. pastoris com pelo menos uma mutação que pode ser complementada com um gene marcador presente num fragmento de ADN transformante. Preferivelmente, utilizam-se as estir-

pes de P. pastoris mutantes auxotróficas $his4^-$ (GS115).

A "cassette" de expressão contendo uma única cópia do gene SOD sob a regulação do promotor AOX1 e um terminador de transcrição, é colocada num vector de expressão de Pichia baseado no pBR322, que inclui também um gene marcador seleccionável, tal como o gene HIS4, se a estirpe hospedeira de P. pastoris é um mutante auxotrófico $his4^-$.

Preferivelmente, a "cassette" de expressão é integrada no genoma do hospedeiro por transformação do hospedeiro com um plasmídeo circular não cortado compreendendo a "cassette". A integração realiza-se pela adição num local ou locais com homologia com uma ou mais sequências presentes no vector de transformação, p.e., 5'AOX1, 3'AOX1, HIS4 e deixará intacto o gene AOX1. Deste modo obtêm-se estirpes Mut^+ que mostram o crescimento do tipo selvagem em metanol. Verificou-se que uma estirpe Mut^+ contendo duas cópias integradas da "cassette" de expressão era superior, resultando numa concentração de hSOD consideravelmente mais elevada do que a obtida com estirpes de cópia única. É possível introduzir cópias adicionais da "cassette" de expressão numa estirpe hospedeira usando um plasmídeo contendo duas ou mais "cassettes" de expressão do gene da SOD, preferivelmente ligadas em tandêm, aumentando-se, deste modo, ainda mais a produtividade.

Alternativamente, a "cassette" de expressão pode ser integrada no genoma do hospedeiro após digestão do vector de expressão com uma enzima apropriada obtendo-se um fragmento de ADN linear com terminais homólogos do local AOX1, por uma técnica de substituição do gene num só passo. Como resultado da substituição do gene obtêm-se estirpes Mut^- . O gene AOX2 ainda funcional fornece álcool-oxidase suficiente para o crescimento lento em metanol.

Em qualquer dos casos, o desenvolvimento de transformantes pelo uso de vectores de integração em oposição aos baseados em plasmídeos autónomos resulta em estirpes recombinantes produtivas, mais estáveis. Os transformantes nos quais se integrou a "cassette" de expressão que cindiu o local AOX1 por recombinação dirigida a esse

sítio, podem ser seleccionados pelo seu fenótipo $his4^+$ e pela sua capacidade diminuída em utilizar o metanol (Mut^-). Por hibridação de mancha Southern verificou-se que toda a "cassette" de expressão tinha sido integrada no local AOX1. Os transformantes positivos foram caracterizados por análise Southern para o local da integração do ADN e por análise Northern para avaliar a transcrição do gene da SOD que responde ao metanol. As estirpes de P. pastoris que têm integradas uma ou múltiplas cópias da "cassette" de expressão no sítio desejado são identificadas por hibridação de mancha Southern.

Os transformantes de P. pastoris que são identificados como tendo o genótipo e o fenótipo desejados são cultivados em fermentadores. Tipicamente, usa-se um processo de produção em dois passos. Inicialmente, as células são cultivadas numa fonte de carbono repressora, preferivelmente glicerol. Nesta fase gera-se massa celular na ausência de expressão. Após a exaustão do glicerol, adicionam-se ao fermentador, metanol sózinho (alimentação de metanol-modo descontínuo) ou glicerol e metanol (alimentação de substrato misto - modo descontínuo), resultando na expressão do gene da SOD dirigida pelo promotor AOX1. As estirpes Mut^+ são preferivelmente cultivadas usando um procedimento de alimentação descontínua de metanol, no qual se limita o metanol residual. As estirpes Mut^- , por outro lado, são cultivadas preferivelmente, usando quer o procedimento descontínuo com alimentação de metanol, quer o procedimento descontínuo com alimentação de substrato misto, nos quais o metanol residual é mantido em excesso.

Os polipéptidos com actividade de SOD são produzidos em P. pastoris, intracelularmente e são usualmente extraídos das células de Pichia lisadas com pérolas de vidro na presença de tampões simples conhecidos na arte. Tipicamente, usa-se um tampão 50 mM de fosfato de sódio ou de potássio, contendo EDTA 0,1 mM a pH 7,8, e a recuperação, após as correcções, para ter em conta o volume de sedimento, é de pelo menos 95%, quando medida por manchas Western ou por um ensaio de actividade. A pequena quantidade do produto de SOD que permanece no sedimento pode ser extraída com um de-

tergente forte tal como dodecilsulfato de sódio (SDS).

O presente invento é adicionalmente ilustrado pelos exemplos seguintes não limitativos.

3. Exemplos

Exemplo 1

Construção do vector de expressão da hSOD, pSOD104

A construção do vector de expressão descrita no presente invento, foi realizada usando procedimentos convencionais, tal como se descreve, por exemplo, em Maniatis et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, EUA (1982) e Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc. Nova Iorque (1986).

O gene da SOD humana (ver Fig. 1) foi recebido na forma de um fragmento BamHI/PstI no plasmídeo pEMBL8, bem como num plasmídeo de expressão, pKK223-3, transformado em células de E. coli JM 105, mas pode também ser obtido a partir de qualquer dos vectores anteriormente publicados, tal como se refere supra.

Transformaram-se células de E. coli MC1061 (que estão facilmente disponíveis) com o plasmídeo pEMBL8 e seleccionaram-se colónias amp^R. O plasmídeo foi preparado a partir das células amp^R e digerido com BamHI e PstI. O plasmídeo correcto continha uma inserção BamHI/PstI de 480 pb constituída pelo gene da hSOD. Usou-se esta colónia para preparar um novo ADN plasmídeo, digeriu-se o plasmídeo com BamHI e PstI, e ligaram-se 50 ng do fragmento de 480 pb (isoladas num gel de agarose a 0,8%) a 10 ng de plasmídeo M13mpl9 [New England Biolabs], tratado com fosfatase, cortado com BamHI - PstI, para sequenciação e mutagénese. Transformaram-se células JM 103 (que estão facilmente disponíveis) com a mistura de ligação e seleccionaram-se as placas brancas. O plasmídeo foi preparado a partir das placas brancas e digerido com BamHI e PstI. Uma banda de

480 pb era indicativa do plasmídeo correcto que foi designado por pSOD101. A banda que se supunha incluir a sequência de codificação da hSOD foi totalmente sequenciada num sentido e a sequência obtida estava de acordo com a do gene da hSOD autêntica (Fig. 1).

Adicionou-se então um sítio EcoRI ao terminal 3' da sequência de codificação da hSOD imediatamente a seguir ao codão de terminação da tradução TAG. A mutagénese dirigida a sítios foi realizada pelo método de Zoller e Smith, Meth. Enzymol, 100 468 (1983). O oligonucleótido de mutagénese tinha a sequência:

5'-GGA TCG CCC AAT AGG AAT TCC AGG CAT GCA AGC TT-3'

O oligonucleótido de análise tinha a sequência:

5'-AAT AGG AAT TCC AGG CA-3'

Realizou-se uma preparação de mini-molde nos positivos da análise e transformaram-se células JM103 com a preparação. Analisaram-se as placas brancas uma segunda vez com o oligonucleótido de análise e os positivos desta segunda análise foram usados para preparar moldes para a sequenciação. A sequenciação foi realizada seguindo o método de didesoxilo de Sanger, Sanger et al., PNAS 74: 5463 (1977) usando o iniciador universal de sequência GTA AAA CGA CGG CCA GT. Identificou-se um plasmídeo com o terminal 3' correctamente modificado, e foi designado por pSOD102.

O terminal 5' da inserção de hSOD foi modificado para adicionar um sítio EcoRI imediatamente antes do codão ATG iniciador. A mutagénese foi realizada pelo mesmo método do que a mutagénese 3' com a excepção de o plasmídeo de partida ter sido o pSOD102; o oligonucleótido de mutagénese tinha a sequência:

5'-TCG AGC TCG GTA CCC AAG AAT TCA TGG CGA CGA AGG CC-3'

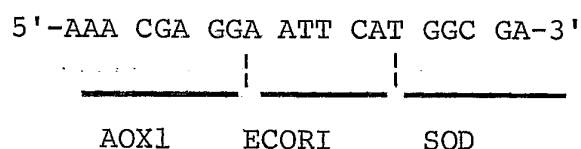
O oligonucleótido de análise tinha a sequência:

5'-TAC CCA AGA ATT CAT G-3'

e o oligonucleótido de sequenciação foi o iniciador universal.

A sequenciação confirmou o terminal 5' do plasmídeo correctamente modificado por mutagénese. O plasmídeo com sítios EcoRI nos terminais 5' e 3' da inserção de hSOD foi designado por pSOD103.

O plasmídeo pSOD103 foi digerido com EcoRI e isolou-se o fragmento com cerca de 480 pb num gel de agarose a 0,8%. Ligaram-se 50 ng do fragmento de hSOD a 10 ng de pAO804, tratado com fosfatase, cortado com EcoRI. (A preparação do plasmídeo pAO804 é aqui depois descrita). Transformou-se o produto da ligação em células MC1061 e seleccionaram-se as colónias amp^R. O plasmídeo correcto foi identificado em amostras recolhidas por pesquisa com um oligonucleótido com a sequência:

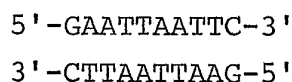


O plasmídeo correcto foi designado por pSOD104.

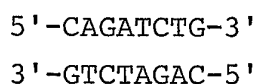
O plasmídeo pAO804 utilizado no procedimento anterior foi construído como se segue:

Modificou-se o plasmídeo pBR322 como se segue, para eliminar o sítio EcoRI e inserir um sítio BglIII no sítio PvuII:

Digeriu-se o pBR322 com EcoRI, preencheram-se os terminais salientes com o fragmento Klenow de ADN-polimerase I de E. coli e o ADN resultante foi de novo tornado circular usando ligase T4. Usou-se o ADN circular para transformar E. coli MC1061 conferindo-lhe resistência à ampicilina e testaram-se os transformantes para avaliar a existência de um plasmídeo com cerca de 4,37 kpb de comprimento, sem um sítio EcoRI. Seleccionou-se um destes transformantes e cultivou-se obtendo-se um plasmídeo designado por pBR322 Δ RI, que é o pBR322 com o sítio EcoRI substituído pela sequência:



Digeriu-se o pBR322 Δ RI com PvuII e ligou-se o ligante com a sequência:



aos terminais rombos resultantes utilizando ligase T4. Tornaram-se os ADN resultantes de novo circulares, também com ligase T4, e de-

pois digeriram-se com BglII e tornaram-se outra vez circulares usando ligase T4 para eliminar sítios BglII múltiplos devidos à ligação de mais do que um ligante ao pBR322 Δ RI clivado com PvuII. Usaram-se os ADN tratados, para eliminar os múltiplos sítios BglII, para transformar E. coli MC1061 para lhe conferir resistência à ampicilina. Os transformantes foram analisados quanto à presença de um plasmídeo com cerca de 4,38 kpb com um sítio BglII. Selecionou-se um destes transformantes e cultivou-se obtendo-se um plasmídeo designado por pBR322 Δ RIBGL, para o trabalho posterior. O plasmídeo pBR322 Δ RIBGL é igual ao pBR322 Δ RI com a diferença de o pBR322 Δ RIBGL ter a sequência

5'-CAGCAGATCTGCTG-3'

3'-GTCGTCTAGACGAC-5'

em vez do sítio PvuII no pBR322 Δ RI.

Digeriu-se o pBR322 Δ RIBGL com SalI e BglII e isolou-se o fragmento grande (aproximadamente 2,97 kpb). Digeriu-se completamente o plasmídeo pBSAGI5I, que se descreve na Publicação do Pedido de Patente Europeia nº 0226 752, com BglII e XhoI isolou-se um fragmento, com aproximadamente 850 pb, de uma região do local AOX1 de P. pastoris a jusante do terminador de transcrição do gene AOX1 (em relação ao sentido de transcrição do promotor do AOX1). Combinaram-se o fragmento BglII - XhoI do pBSAGI5I e o fragmento SalI - BglII, com aproximadamente 2,97 kpb, do pBR322 Δ RIBGL e submeteram-se a ligação com ligase T4. Usou-se a mistura de ligação para transformar E. coli MC1061 para lhe conferir resistência à ampicilina e analisaram-se os transformantes quanto à presença de um plasmídeo com o tamanho esperado (aproximadamente 3,8 kpb) com um sítio BglII. Este plasmídeo foi designado por pAO801. Ligou-se o terminal pendurado do sítio SalI do pBR322 Δ RIBGL, ao terminal pendurado do sítio XhoI no fragmento pBSAGI5I de 850 pb e, no processo, eliminaram-se ambos os sítios SalI e XhoI no pAO801.

Digeriu-se depois o pBSAGI5I com ClaI e isolou-se o fragmento com aproximadamente 2,0 kpb. O fragmento de 2,0 kpb tem um segmento de aproximadamente 1,0 kpb que compreende o promotor do

AOX1 de P. pastoris e o sítio de iniciação da transcrição, um segmento com aproximadamente 700 pb codificando o antigênio de superfície da Hepatite B ("AgsHB") e um segmento com aproximadamente 300 pb que compreende o sinal de poliadenilação do gene AOX1 de P. pastoris e segmentos codificando sítios e o terminador de transcrição. O segmento codificando o AgsHB do fragmento de 2,0 kpb é rematado, no terminal adjacente ao segmento de 1,0 kpb com o promotor de AOX1, por um sítio EcoRI, e no terminal adjacente ao segmento de 300 pb com o terminador da transcrição de AOX1, com um sítio StuI, e tem o seu subsegmento que codifica o AgsHB orientado e posicionado, em relação ao segmento de 1,0 kpb contendo o promotor e ao segmento de 300 pb contendo o terminador de transcrição, operativamente para expressão do AgsHB por transcrição do promotor de AOX1. O sítio EcoRI que une o segmento promotor ao segmento codificando o AgsHB ocorre imediatamente a montante (em relação ao sentido de transcrição a partir do promotor de AOX1) do tripleto codificando o sinal de início da tradução do promotor de AOX1.

Para mais pormenores sobre os segmentos de promotor e de terminador, do fragmento de 2,0 kpb, que termina num sítio ClaI, do pBSAGI5I, ver Publicação do Pedido de Patente Europeia nº 226 846 e Ellis et al., Mol. Cell Biol. 5, 1111 (1985).

Cortou-se o plasmídeo pA0801 com ClaI e combinou-se, para ligação, usando ligase T4, com o fragmento de 2,0 kpb, que termina num sítio ClaI, do pBSAGI5I. Usou-se a mistura de ligação para transformar E. coli MC1061 para lhe conferir resistência à ampicilina, e analisaram-se os transformantes para determinar a presença de um plasmídeo com a dimensão esperada (aproximadamente 5,8 kpb) que, por digestão com ClaI e BglII, resultou em fragmentos com cerca de 2,32 kpb (com a origem de replicação e o gene de resistência à ampicilina do pBR322) e cerca de 1,9 kpb, 1,48 kpb e 100 pb. Por digestão do plasmídeo com BglII e EcoRI obteve-se um fragmento com aproximadamente 2,48 kpb, com o segmento terminador do gene AOX1 de 300 pb e o segmento de codificação do AgsHB, um fragmento de cerca de 900 pb contendo o segmento a montante do da proteína AOX1 codificando o segmento do gene AOX1 no local AOX1, e um fragmento com cerca de

2,42 kpb contendo a origem de replicação e o gene de resistência à ampicilina do pBR322 e um segmento ClaI - BglII com aproximadamente 100 pb do local AOX1 (mais a montante do segmento codificando o AOX1 do que o primeiro segmento de EcoRI - BglII mencionado, de 900 pb). Este plasmídeo tinha o fragmento ClaI de pBSAGI5I na orientação desejada, uma vez que na orientação oposta indesejada existiriam fragmentos EcoRI - BglII com cerca de 3,3 kpb, 2,38 kpb e 900 pb.

Um dos transformantes contendo o plasmídeo desejado, designado por pA0802, foi selecionado para o trabalho seguinte e foi cultivado para se obter esse plasmídeo. A orientação desejada do fragmento ClaI do pBSAGI5I no pA0802 tinha a região do promotor de AOX1 orientada correctamente para conduzir à integração correcta, no genoma da P. pastoris no local AOX1, do plasmídeo linearizado, preparado cortando no sítio BglII, no terminal do fragmento de 800 pb, a jusante do gene AOX1, no local AOX1 (região de terminação), e no sítio BglII no princípio da região do promotor.

Tratou-se depois o pA0802 para remover o segmento codificando o AgsHB terminado com um sítio EcoRI e com um sítio StuI. Digeriu-se o plasmídeo com StuI e ligou-se um ligante com a sequência:

5'-GGAATTCC-3'

3'-CCTTAAGG-5'

aos terminais rombos usando ligase T4. Tratou-se então a mistura com EcoRI e sujeitou-se de novo a ligação usando ligase T4. Usou-se depois a mistura de ligação para transformar E. coli MC1061 para lhe conferir resistência à ampicilina, e analisaram-se os transformantes para determinar a presença de um plasmídeo com a dimensão esperada (5,1 kpb) com fragmentos EcoRI - BglII, com cerca de 1,78 kpb, 900 pb e 2,42 kpb, e BglII - ClaI com cerca de 100 pb, 2,32 kpb, 1,48 kpb e 1,2 kpb. Este plasmídeo foi designado por pA0803. Seleccionou-se um transformante para o trabalho posterior, contendo o plasmídeo desejado, e cultivou-se de modo a obter-se o pA0803.

Preparou-se depois o plasmídeo pA0804, a partir do pA0803,

inserindo, no sítio BamHI de pBR322 do pAO803, um fragmento BglIII, com aproximadamente 2,75 kpb, do gene HIS4 de P. pastoris. Ver, p.e., Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985) e Publicação dos Pedidos de Patente Europeia nº 0180 899 e 0188 677. Digeriu-se o pAO803 com BamHI e combinou-se com o fragmento terminado num sítio BglIII contendo o gene HIS4 e sujeitou-se a mistura a ligação usando ligase T4. Usou-se a mistura de ligação para transformar E. coli MC1061 para lhe conferir resistência à ampicilina e avaliaram-se os transformantes para determinar a presença de um plasmídeo com a dimensão esperada (7,85 kpb), que é cortado com SalI. Seleccionou-se um destes transformantes e designou-se o plasmídeo nele contido por pAO804.

O pAO804 tem um fragmento SalI - ClaI com cerca de 1,5 kpb e outro com cerca de 5,0 kpb e um fragmento ClaI - ClaI de 1,3 kpb; isto indica que o sentido da transcrição do gene HIS4 no plasmídeo é o mesmo do que o sentido de transcrição do gene de resistência à ampicilina e é o oposto do sentido de transcrição do promotor de AOX1.

A orientação do gene HIS4 no pAO804 não é crítica para a função do plasmídeo ou dos seus derivados, com os segmentos de codificação do ADNC inseridos no sítio EcoRI entre os fragmentos do promotor de AOX1 e de terminação. Assim, um plasmídeo com o gene HIS4 na orientação oposta à do gene HIS4 no pAO804 seria também eficaz para uso de acordo com o presente invento.

Exemplo 2

Desenvolvimento de estirpes de P. pastoris G-SOD104C e G+SOD104C exprimindo hSOD

Usou-se o plasmídeo pSOD104, construído como se descreveu no Exemplo 1 para desenvolver ambas as estirpes Mut⁺ e Mut⁻ da P. pastoris. A estirpe hospedeira foi a GS115 auxotrófica, requerendo histidina (Nº de Acesso 20864 do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, E.U.A. (ATCC), depositado nos termos do Tratado de Budapeste): A transformação foi realizada pelo método dos es-

feroplastos descrito por Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985).

Para desenvolver estirpes Mut⁺ usou-se o pSOD104 não digerido para transformar a GS115 e seleccionaram-se as células His⁺. Examinaram-se nove células prototróficas His⁺ por análise de hibridação Southern. Digeriram-se os ADN cromossômicos com EcoRI e sondaram-se com pAO803, contendo as regiões 5' e 3' do AOX1, ou com pYM4 contendo o gene HIS4 de Pichia. Realizou-se também uma digestão BglIII e sondou-se com um oligonucleótido com a sequência:

5'-AAC TCA TGA ACA TGG AAT CCA TGC AGG CCT-3'

que é homóloga a um segmento do gene da hSOD. Os resultados da análise Southern identificaram três classes de transformantes Mut⁺ que a seguir se sumarizam:

<u>Nome da estirpe</u>	<u>Número de cópias</u>	<u>Sítio de integração</u>
G+SOD104C1,4,5,7,8	um	AOX1
G+SOD104C2,9,10	um	HIS4
G+SOD104C3	dois	HIS4 e AOX1

Cultivaram-se três destes transformantes, G+SOD104C1 (uma cópia no local AOX1), G+SOD104C3 (uma cópia em ambos os locais AOX1 e HIS4), e G+SOD104C10 (uma cópia no local HIS4), em balões agitados conjuntamente com o controlo negativo, GS115 não transformada. Cultivaram-se as células em glicerol tal como aqui depois se descreve para as estirpes Mut⁻, lavaram-se e semearam-se com uma DO₆₀₀ de cerca de 0,05 em YBN tamponado 1X (0,067% de Base de Azoto de Levedura) contendo 1% de metanol. Removeram-se alíquotas, cada uma contendo 50 DO, após 20, 23 e 26 horas de crescimento em metanol, para análise dos níveis de hSOD e de ARNm.

O ARN foi analisado por manchas Northern. Desnaturaram-se aproximadamente 5 μ g do ARN total de cada amostra colhida nos vários instantes, separou-se num gel de formaldeído-agarose, e transferiu-se para nitrocelulose. Sondou-se a mancha, com um oligonucleótido de 30 bases de comprimento (a mesma sequência oligonucleotídica

ca que anteriormente) e homólogo do hSOD. O ensaio de hibridização Northern indicou que existia uma quantidade significativa de ARNm de hSOD em todos os instantes. O transformante G+SOD104C3, que contém duas cópias do vector de expressão, pareceu ter várias vezes mais ARNm de hSOD do que os outros dois transformantes. O controlo, GS115, mostrou não ter qualquer ARNm homólogo da sonda de oligonucleótido. Todos os três transformantes pareceram possuir actividade de hSOD usando a separação e o ensaio electroforéticos (que se descrevem no Exemplo 4).

Para desenvolver as estirpes Mut⁻, usou-se um digerido BglIII do plasmídeo pSOD104 para transformar células GS115, e seleccionaram-se as células His⁺. As células His⁺ prototróficas foram depois testadas relativamente ao seu fenótipo Mut como se segue:

A pesquisa do fenótipo Mut foi realizada cultivando em placa os transformantes His⁺, em placas principais de meio mínimo de glicerol (2%), obtendo-se colónias originárias de um único tipo de células. Após dois dias de incubação a 30°C, replicaram-se as células principais em placas de meio mínimo de glicerol e em placas não contendo qualquer fonte de carbono, às quais se adicionou metanol na fase de vapor. Isto foi realizado adicionando uma gota de metanol, aproximadamente 200 µl, à parte inferior do topo da cobertura da caixa de petri que contém a cultura em placa. Incubaram-se as placas a 30°C durante dois dias adicionando-se todos os dias metanol na fase de vapor. As colónias mostrando um crescimento visível foram contadas como Mut⁺ e as que não mostraram qualquer crescimento visível foram contadas como Mut⁻.

Aproximadamente 12% dos transformantes cresciam lentamente, o que é indicador da quebra do local AOX1. Compararam-se vinte e dois destes transformantes com a estirpe de controlo, G-PA0804, em relação às velocidades de crescimento em metanol. A estirpe G-PA0804 foi desenvolvida quebrando o local AOX1 com um digerido BglIII do plasmídeo de base pA0804. Esta apresenta o fenótipo Mut⁻ esperado mas não exprime um produto do gene recombinante. Todos os transformantes hSOD Mut⁻ pareceram crescer, aproximadamente, à mes-

ma velocidade do que o G-PAO804. Uma velocidade de crescimento mais lenta pode ser indicativa de toxicidade para as células do produto de gene heterólogo.

Nove das células His⁺Mut⁻ foram analisadas por manchas de Southern, tal como aqui anteriormente se descreveu. Verificou-se que todas as nove estirpes tinham integrado uma cópia da "cassette" de expressão no local AOX1, quebrando assim o gene. Estas estirpes foram designadas por G-SOD104C1 a G-SOD104C9.

Cultivaram-se três destas estirpes, bem como a estirpe de controlo, em balões agitados para analisar o nível e a natureza regulada por metanol do ARNm específico da hSOD. Estas células foram cultivadas até à fase estacionária em YBN (Base de Azoto de Levedura 0,67%) tamponado 1X contendo 5% de glicerol, lavaram-se com água e semearam-se a uma DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0, no meio YBN 1X contendo 1% de metanol. Após 48, 96 e 120 horas de crescimento em metanol, retiraram-se alíquotas, cada uma contendo 100 OD, para a determinação dos níveis de hSOD e de ARNm.

O ARN foi analisado por manchas Northern como anteriormente se descreveu. As três estirpes pareceram ter quantidades semelhantes de ARNm de SOD com cada estirpe possuindo mais/no primeiro instante de colheita, i.e., logo inicialmente no crescimento em metanol do que nos dois últimos instantes de colheita de amostras. A estirpe de controlo não tinha ARNm que se hibridasse com a sonda de oligonucleótido. Todas as três estirpes transformantes possuíam actividade de hSOD tal como foi determinado por separação e ensaio de electroforese (que se descreve no Exemplo 4).

Exemplo 3

Crescimento de estirpes de P. pastoris exprimindo hSOD em fermentadores de 1 litro.

Com base nos resultados da expressão em balões agitados, testaram-se duas das estirpes Mut⁺, G+SOD104C10 (uma cópia) e G+SOD104C3 (duas cópias), e uma das estirpes Mut⁻, G-SOD104C5, em

fermentadores de 1 litro para avaliar a produção de hSOD. Cultivaram-se as células Mut^+ de um modo de alimentação descontínua, com uma concentração de metanol limitada, e as células Mut^- foram cultivadas de um modo de alimentação descontínua, com um excesso de metanol, e de um modo de alimentação descontínua, com uma alimentação mista, como a seguir se descreve:

A. Modos de Fermentação

1. Alimentação descontínua de metanol, quantidade limitada de MeOH, fenótipos Mut^+

Ensaio 441	G+SOD104C3	(cópia dupla)
Ensaio 442	G+SOD104C10	(cópia simples no HIS4)
Ensaio 459	G+SOD104C10	(cópia simples no HIS4)
Ensaio 460	G+SOD104C3	(cópia dupla)

Esterilizou-se o fermentador em autoclave com 700 ml de um meio de sais mínimos (concentração final de sais de 3,3 X) e com 4% de glicerol. Após a esterilização, adicionaram-se 3 ml de YTM4 e 3 ml de IM1 e ajustou-se o pH a 5 com solução concentrada de NH_4OH . Depois, manteve-se o pH 5 pela adição de solução de NH_4OH diluída (1:4), contendo 0,1% de agente anti-espuma Struktol J673 (Struktol Co., Stow, OH, E.U.A.). Os inóculos foram preparados a partir de placas selectivas e cultivados, de um dia para o outro, a 30°C, em solução com 0,67% de base de azoto de levedura, tampoadada com fosfato (pH 5), contendo 2% de glicerol. Inoculou-se o fermentador com as células cultivadas e o regime de crescimento descontínuo durou pelo menos 18 a 24 horas. Na altura da exaustão de substrato, iniciou-se uma alimentação de glicerol a 50% (contendo 12 ml/l de YTM4 e de IM1) com 12 ml/h durante 7 horas. No instante de exaustão do substrato, usualmente após 6 horas de alimentação de glicerol, iniciou-se uma alimentação de MeOH (contendo 12 ml/l de YTM4 e de IM1), com 1,5 ml/h, e adicionaram-se mais 3 ml de YTM4 e de IM1 ao fermentador. Durante as 10 horas seguintes fizeram-se ajustes de 10% de 30 em 30 minutos até se ter um caudal de alimen-

tação final de 7,5 ml/h. A colheita do vaso reaccional foi efectuada 48 - 80 horas após a indução com MeOH.

2. Quantidade limitada de NaOH, cultura contínua, fenótipo Mut⁺

Ensaio 476 G+SOD104C3 (cópia dupla)

O fermentador foi preparado como aqui anteriormente se descreveu para o protocolo de alimentação descontínua com quantidade limitada de MeOH. Após a exaustão do glicerol, iniciou-se uma alimentação de MeOH a 5% (contendo sais de base 4X, 12 ml de YTM4 e de IML por litro de MeOH), com 10 ml/h. Aumentou-se o caudal de MeOH a 5% até 60 ml/h durante as seis horas seguintes. Quando o volume de líquido no reactor atingiu 1 litro (em aproximadamente 30 horas), iniciou-se uma corrente de recolha com um caudal igual ao caudal de alimentação para manter um volume constante de 1 litro no fermentador.

Após 143 horas em MeOH, adicionou-se ao reactor 1 ml de uma solução de 1% de cobre e de zinco. Após 295 horas em MeOH, diminuíram-se os caudais de alimentação e de efluente até um valor de 30 ml/h. Passou-se da cultura contínua para o modo de alimentação descontínua, passando da alimentação de MeOH a 5% para uma alimentação de MeOH a 100% (mais 12 ml/l de YTM4 e de IML) e parando com a corrente de efluente. O modo de alimentação descontínua foi realizado como anteriormente se descreveu, durante um período de 72 horas, com um total de 503 horas de MeOH para todo o ensaio.

3. Alimentação descontínua de Metanol, excesso de MeOH, fenótipos Mut⁻

Ensaio 445 G-SOD104C5 (cópia simples no AOX1)

Preparou-se o fermentador e inoculou-se, como anteriormente se descreveu para o ensaio de alimentação descontínua com metanol com a estirpe Mut⁺. No instante da exaustão de substrato iniciou-se uma alimentação de metanol (contendo 12 ml/l de YTM4 e de IML),

com 0,5 ml/h e ao fermentador adicionaram-se mais 3 ml de YTM4 e de IM1. Aumentou-se o caudal de alimentação durante o decorrer da fermentação para manter uma concentração residual de MeOH de aproximadamente 4 g/l. A colheita do vaso reaccional foi efectuada 6 a 10 dias após a indução com MeOH.

4. Alimentação descontínua, alimentação mista, fenótipo Mut⁻

Ensaio 446 G-SOD104C5 (cópia simples no AOX1)

Preparou-se o fermentador e inoculou-se, como anteriormente se descreveu para o ensaio de alimentação descontínua de metanol com a estirpe Mut⁺. No instante da exaustão do substrato, iniciou-se uma alimentação com glicerol a 50% (contendo 12 ml/l de YTM4 e de IM1) com 5,4 ml/h durante 6 horas. Depois, reduziu-se o caudal de alimentação de glicerol para 3,6 ml/h, adicionaram-se 3 ml de YTM4 e 3 ml de IM1, e iniciou-se uma alimentação de MeOH (contendo 12 ml/l de YTM4 e de IM1). O caudal inicial de adição de MeOH foi de cerca de 1 ml/h (razão de alimentação MeOH:glicerol de 0,7:1). Durante as 10 horas seguintes fizeram-se ajustes com incrementos de 10%, de 30 em 30 minutos, até se atingir um caudal de alimentação final de 4,9 ml/h (razão de alimentação MeOH/glicerol de 2:1). Ajustou-se o caudal de alimentação de MeOH de modo a que a concentração residual de MeOH não excedesse 4 g/l. A colheita do vaso reaccional foi efectuada 80 horas após a indução com MeOH.

B. Resultados da Fermentação

As curvas de evolução com o tempo da figura 2A mostram a construção do valor de densidade celular medida pelo peso húmido (p.hum.) de células empacotadas nos Ensaios 441, 442, 445 e 446. Os perfis de crescimento celular foram típicos dos que são vulgarmente observados nos modos de fermentação 1, 3 e 4, que anteriormente se descreveram.

As estirpes Mut⁺ dos ensaios 441 e 442 (cópia dupla e sim-

ples, respectivamente) atingiram uma densidade de células elevada (340 - 350 g p.hum./l) em apenas 54 horas, utilizando o protocolo de alimentação descontínua de metanol (Modo de Fermentação 1). O protocolo de alimentação descontínua de metanol, normalmente usado para as estirpes Mut⁻ (Modo de Fermentação 3) resulta num tempo de fermentação muito mais prolongado, tipicamente de 6 a 10 dias. Isto é ilustrado pelo Ensaio 445 que requereu 150 horas para atingir um valor de densidade celular de 280 g p.hum./l. Usando uma estratégia de alimentação mista no ensaio 446 (Modo de Fermentação 3), demonstrou-se que a estirpe Mut⁻ G-SOD104C5 podia ser cultivada rapidamente até uma densidade equivalente à das estirpes Mut⁺; atingiu-se uma densidade celular de 380 g p.hum./l (95 g peso seco l) em 80 horas.

A evolução com o tempo da expressão de hSOD nos ensaios 441, 442, 445 e 446 (Figura 2B) indica que nestes Ensaios os níveis da hSOD mais elevados (3500 kU/l ou 0,92 g/l com base numa actividade específica de 3,8 U/ug) foram produzidos pela estirpe de cópia dupla G+SOD104C3. Esta estirpe demonstrou possuir também uma das produtividades específicas mais elevadas, 240 U/g de p.hum. x h como se indica na Tabela I.

De entre as estirpes de cópia única, o nível de expressão e a produtividade específica foram mais elevados nas estirpes Mut⁺, seguindo-se as estirpes Mut⁻ cultivadas num substrato misto. As células Mut⁻ cultivadas num modo com alimentação descontínua com metanol limitado foram menos produtivas do que as outras.

Tal como é indicado por resultados similares e pelas produtividades específicas (Tabela I) os ensaios 441 e 442 foram reproduzidos com sucesso nos Ensaios 460 e 459, respectivamente. Estes dois últimos ensaios foram induzidos em metanol durante 80 horas. Uma vez que o rendimento em hSOD é proporcional à quantidade de massa celular produzida sob condições indutoras, nos ensaios mais prolongados (Figura 2C) obtiveram-se níveis de expressão mais elevados, de 5100 kU/l e de 1400 kU/l, respectivamente. Com base na determinação dos inventores da actividade específica da hSOD, o melhor

70 618

48604

- 35 -

nível de expressão foi conseguido no Ensaio 460. Produziram-se 1,3 g de hSOD por litro de volume de fermentador.

TABELA I

Expressão de hSOD em estirpes de Pichia

Ensaio	Estirpe	Fenótipo	nº de cópias	SOD		h	P.hum.		Produtividade	
				MÁX kU/l	MÁX g/l		MÁX g/l	U/gxh	Específica U/gxh	Produtividade Volumétrica kU/lxh
441	G+SOD104C3	Mut ⁺	2	3500	0,92	54	340	240		62
442	G+SOD104C10	Mut ⁺	1	1100	0,29	54	359	72		18
459	G+SOD104C10	Mut ⁺	1	1400	0,37	79	421	58		16
460	G+SOD104C3	Mut ⁺	2	5100	1,34	80	411	220		66
476 ¹	G+SOD104C3	Mut ⁺	2	640	0,17	431	80	330		38
476 ²	G+SOD104C3	Mut ⁺	2	4600	1,21	503	350	204		55
445	G-SOD104C5	Mut ⁻	1	700	0,18	143	277	26		5,9
446	G-SOD104C5	Mut ⁻	1	920	0,24	71	382	50		13

¹ O Ensaio 476 foi primeiro realizado num modo de cultura contínua, seguido de um modo de cultura descontínua.

No modo de cultura contínua os níveis de hSOD foram mantidos durante 431 h e eram insensíveis à adição de cobre e de zinco ao reactor.

² Modo de alimentação descontínua do Ensaio 476

Tal como aqui anteriormente se descreveu, o Ensaio 476 foi realizado primeiro num modo de cultura contínua, seguido de um modo de cultura descontínua. Na cultura contínua, os níveis de hSOD foram mantidos durante 431 horas e eram insensíveis à adição de cobre ou de zinco ao reactor. Como se ilustra na Tabela I, com a estirpe G+SOD104C3 de cópia dupla, fermentada de acordo com este protocolo de fermentação, obteve-se a melhor produtividade específica (330 U/gxh).

Os níveis de expressão de hSOD anteriormente referidos são baseados nos resultados de ensaios de actividade que aqui a seguir se descrevem no Exemplo 4. Uma vez que os ensaios de actividade podem apenas determinar as moléculas funcionais, as enzimas desnaturadas ou inactivas escaparão à detecção. Deste modo, os níveis de expressão indicados são valores limite inferiores; os níveis verdadeiros são iguais ou superiores a estes valores.

Exemplo 4

Caracterização da hSOD

A. Ensaios de actividade

(O princípio dos ensaios de actividade de SOD está ilustrado na Figura 3)

1. Ensaio do nitrito

O ensaio do nitrito [Y. Oyanagui, Anal. Biochem. 142 290 (1984)] foi usado para medir a actividade de hSOD. Este ensaio é baseado na oxidação da hidroxilamina, pela hSOD, em nitrito que é depois detectado com um corante indicador.

O ensaio do nitrito tem provado ser particularmente bem sucedido na medição de concentrações de hSOD em lisados de Pichia. Na Tabela II mostra-se que várias amostras colhidas durante os ensaios de fermentação deram valores de actividade elevada, enquanto que com a amostra de controlo (G-PA0804) se obtém um valor muito mais baixo, frequentemente tão pequeno quanto 5% do obtido com as estirpes recombinantes. Assim, este ensaio pode diferenciar a activi-

dade de hSOD recombinante de outras actividades semelhantes à de SOD no lisado e, como se mostra na Tabela II, com um desvio geralmente inferior a 10%.

TABELA II

<u>Variação do Ensaio de SOD</u>		
Amostra de Ensaio (Ensaio nº-horas)	Actividade ¹ (unidades/ul)	Desvio ² , %
441-21	0,791	10,44
441-54	1,779	4,00
442-21	0,385	6,94
442-54	0,569	11,40
445-34	0,340	6,89
445-143	0,442	6,85
804 (controle)	0,089	17,10

¹ Os números representam a média dos valores de 4 ensaios.

² Calculado a partir do desvio padrão da amostra em relação ao valor médio.

O ensaio do nitrito foi normalizado em relação ao ensaio do citocromo c, testando um padrão de SOD de eritrócitos humana (Sigma Chemical Company) e a SOD recombinante humana purificada de *P. pastoris* em cada um dos ensaios. De acordo com o fabricante, a SOD de eritrócitos tem uma actividade específica de 2,7 unidades/ug no ensaio do citocromo c. Neste ensaio, os inventores determinaram uma actividade específica de 3,8 unidades/ug e verificou-se que a hSOD recombinante purificada, preparada de acordo com a invenção, tinha o mesmo valor de actividade específica. Todas as concentrações de proteínas foram verificadas usando análise quantitativa de aminoácidos. O ensaio de nitrito deu também valores idênticos para as duas preparações. Deste modo, pode usar-se o ensaio de ni-

trito, mais simples e mais discriminante, para testar amostras de lisado, se os valores obtidos para as amostras desconhecidas forem sempre comparados com os obtidos com a enzima pura de actividade específica conhecida.

2. Separação e ensaio de electroforese

As actividades de hSOD endógena e heteróloga na P. pastoris podem ser separadas e testadas num gel de acrilamida após electroforese não desnaturante. Para este ensaio, o gerador e o detector de superóxido mais convenientes são, respectivamente, a riboflavina/TEMED e o azul de tetrazólio (NBT) [Beauchamp et al., Anal. Biochem. 44, 276 (1971)]. O NBT é convertido no produto azul através do gel com excepção das áreas onde está presente SOD que destrói o superóxido. Separaram-se os extractos de células transformadas, cultivadas em balões agitados, por electroforese e verificou-se que tinham actividade de SOD que co-migra com o padrão humano. Os extractos de células de controlo também produziram uma zona limpa nos geles, mas esta situava-se numa região do gel bem isolada da posição da forma humana da SOD, com uma maior mobilidade electroforética. Surpreendentemente, as células transformadas que exprimiam níveis máximos de SOD humana não produziram qualquer actividade digna de nota na posição do gel correspondente à das células de controlo. Existia contudo uma nova zona limpa que apareceu para uma mobilidade intermediária entre a posição da SOD de P. pastoris endógena e a posição da SOD humana recombinante. Isto sugere que pode formar-se um heterodímero entre a SOD de P. pastoris endógena e a SOD humana recombinante.

Numa separação e ensaio de electroforese típicos, submeteram-se alíquotas, equivalentes a 4 μ l de extractos, em fosfato 50 mM, pH 7,8, a electroforese não desnaturante e geraram-se e detectaram-se os radicais superóxido como anteriormente se descreveu.

B. Imunodeteção

Usou-se anti-soro de cabra para hSOD autêntica. Como segun-

do anticorpo usou-se anti-soro de coelho anti-IgG de cabra (Organon Teknika, Westchester, PA), para aumentar a eficiência de ligação da ^{125}I -Proteína A.

Usou-se electroforese em gel de poliacrilamida - SDS para separar a hSOD dos componentes que reagem de um modo cruzado em lisados de P. pastoris. Reduziram-se as amostras, desnaturaram-se e submeteram-se a electroforese em geles de acrilamida a 15% para resolver os monómeros de hSOD de 16 kilodalton. Os lisados de transformantes de SOD cultivados em balão agitado tinham uma banda imunorreactiva que co-migrava com o padrão de hSOD e com o material que reagia de um modo cruzado, de peso molecular aparente mais elevado. Os lisados de controlo, por outro lado, tinham uma imunorreactividade muito pequena na região hSOD do gel, mas mostravam o mesmo material de peso molecular elevado. Quando se compararam lisados de balões agitados a estirpe Mut⁺ de duas cópias (G+SOD104C3) exibiu consistentemente uma banda mais intensa do que qualquer das estirpes de cópia única.

As manchas Western podem proporcionar uma medida quantitativa de quantidade de proteína imunorreactiva num lisado, por comparação cuidadosa, no mesmo gel, com várias concentrações de padrão. Os resultados das manchas Western quantitativas confirmaram e complementaram os resultados obtidos a partir do ensaio espectrofotométrico de nitritos e dos geles de actividade NBT. As quantidades medidas de actividade de hSOD e de proteína hSOD eram as mesmas a menos do erro experimental. Esta é uma comparação importante pois sugere que todos os polipéptidos hSOD estão adequadamente dobrados e totalmente activos. Adicionalmente, a coloração com Azul de Coomassie quer dos geles desnaturantes, quer dos geles nativos, mostrou bandas claramente visíveis que co-migram com o padrão de hSOD. Estas bandas de Coomassie tinham a intensidade esperada de acordo com as outras estimativas da proteína hSOD total na amostra. Uma vez que os geles desnaturantes separam de acordo com o tamanho e que os geles nativos separam com base na dimensão e na carga, o facto de a hSOD recombinante co-migrar com o padrão em ambos os sistemas constitui evidência de que a enzima recombinante produzida na Pichia

está adequadamente dobrada, tem o tamanho correcto e apresenta a carga superficial adequada.

Exemplo 5

Purificação e estabilidade da hSOD produzida em P. pastoris

Extraiu-se mais do que 90% da hSOD recombinante de células de P. pastoris lisadas com pérola de vidro na presença de tampões simples. Tipicamente, usou-se um tampão de fosfato de sódio ou potássio 50 mM contendo EDTA 0,1 mM, a pH 7,8, e a recuperação, após correcções para ter em conta o volume de resíduos sólidos, foi, pelo menos, 95% quando medida, quer pelo ensaio de actividade, quer por manchas Western. (Pode usar-se qualquer tampão no qual a enzima seja estável.) A hSOD recombinante foi purificada a partir do lisado de células, essencialmente como se descreveu em McCord et al., J. Biol. Chem. 241, 6049 (1969) para lisados de eritrócitos.

A hemoglobina é precipitada a partir da preparação de eritrócitos por um tratamento de etanol-clorofórmio. De modo semelhante removeram-se muitas proteínas de levedura de lisados de P. pastoris. À suspensão de lisado, agitada, adicionou-se, gota a gota, etanol, 25% do volume de lisado, e manteve-se a suspensão a uma temperatura inferior a 4°C num banho de água salgada-gelo. De um modo similar adicionou-se clorofórmio (15 por cento do volume de lisado inicial). Deixaram-se as proteínas contaminantes desnaturar e precipitar, por agitação durante 15 minutos adicionais no banho de gelo, e removeu-se o precipitado por centrifugação.

A superóxido-dismutase foi purificada adicionalmente por um passo de extracção de fase. Ao sobrenadante adicionou-se fosfato de potássio dibásico e aqueceu-se até 25°C. Quando na solução de etanol-clorofórmio se dissolveram trinta por cento de K_2HPO_4 (peso/volume), a hSOD passou-se da fase inferior com uma concentração de sal elevada para a fase superior. A fase superior foi arrefecida a 4°C e clarificada por centrifugação.

A hSOD recombinante foi concentrada por precipitação com

acetona fria (75% do volume de sobrenadante), centrifugou-se e res-suspendeu-se num volume reduzido. A solução foi dialisada até ao equilíbrio contra fosfato de potássio 2,5 mM, pH 7,8. (Em vez do tampão de fosfato de potássio pode usar-se qualquer tampão de força iónica baixa, a um pH próximo da neutralidade.) Este tampão deverá ser um tampão de equilíbrio para o DE-52, ou para qualquer outro permutador de aniões similar, usado no passo seguinte. A hSOD foi eluída a partir do DE-52 num gradiente de fosfato de potássio 2,5 a 100 mM, pH 7,8.

Quando armazenada na forma de lisado a 3 - 5°C, a actividade de hSOD é estável durante pelo menos quatro semanas. Na forma de proteína purificada a hSOD recombinante de P. pastoris é estável pelo menos durante oito semanas a 3 - 5°C.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de preparação de polipéptidos com actividade SOD caracterizado por compreender a cultura de transformantes de P. pastoris contendo no seu genoma pelo menos uma cópia de uma sequência de ADN codificando operavelmente no P. pastoris um polipéptido com actividade SOD em associação operacional com uma região promotora de um gene de P. pastoris sob condições de modo a permitir a expressão da referida sequência de ADN na referida P. pastoris.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os referidos transformantes de P. pastoris conterem, no seu genoma, pelo menos duas cópias das referidas sequências de ADN.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os referidos transformantes de P. pastoris conterem no seu genoma pelo menos uma cópia de uma "cassette" de expressão, compreendendo, na direcção de transcrição, uma região promotora de um primeiro gene de P. pastoris, uma sequência de ADN codificando no P. pastoris um polipéptido com actividade SOD e um terminador de transcrição de um segundo gene de P. pastoris, os referido primeiro e segundo genes de P. pastoris sendo idênticos ou diferentes, e os segmentos da referida "cassette" de expressão estando em associação operacional.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os referidos transformantes serem obtidos por transformação com um fragmento de ADN.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os referidos transformantes serem cultivados num meio contendo metanol como fonte de carbono.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por os referidos transformantes serem desenvolvidos a partir da estirpe GS115 de P. pastoris his4⁻.

- 44 -

7 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os referidos transformantes terem o fenótipo Mut⁻.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os referidos transformantes terem o fenótipo Mut⁺.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender o passo de colheita do referido SOD dos referidos transformantes.

Lisboa, 13. FEV. 1990

Por THE SALK INSTITUTE BIOTECHNOLOGY/
/INDUSTRIAL ASSOCIATES, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

1/6

11-10
1/6-1/6

1 ggatccatggcgacgaaggccgtgtgcgtgtgaaggcgacggcccagtgcaaggcatc + 60
 cctaggtagcgcgtctccggcacacgcacgacttcccgctgccgggtcacgtcccgttag
 GlySerMetAlaThrLysAlaValCysValLeuLysGlyAspGlyProValGlnGlyIle -
61 atcaatttcgagcagaaggaaagtaatggaccagtgtaagggtgtggggaagcattaaagga + 120
 tagttaaagctcgtctcttcctttcattacctgggtcacttccacaccccttcgtaatttcct
 IleAsnPheGluGlnLysGluSerAsnGlyProValLysValTrpGlySerIleLysGly -

FIG. 1-1

2/6

10/11/81

121 ctgactgaaggcctgcatggattccatgttcatgagtttgagataatacggcaggctgt + 180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gactgacttccggacgtacctaaaggtactcaaacctctattatgccgtccgaca

LeuThrGluGlyLeuHisGlyPheHisValHisGluPheGlyAspAsnThrAlaGlyCys -

181 accagtgcaggtcctcactttaatcctctatccagaaaacacgggtggccaaaggatgaa + 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tggtcacgtccaggagtgaataataggagataggtctttgtgccaccggtttcctactt

ThrSerAlaGlyProHisPheAsnProLeuSerArgLysHisGlyGlyProLysAspGlu -

FIG. 1-2

gagaggcatgttgagacttgggcaatgtgactgtgacaaagatggtgtggccgatgtg 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ctctccgtacaacctctgaacccggttacctgacgactgtttctaccacacccggctacac
 GluArgHisValGlyAspLeuGlyAsnValThrAlaAspLysAspGlyValAlaAspVal -

tctattgaagattctgtgatctcactctcaggagaccatttgcatcatgtggccgcacactg 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 agataacttctaagacactagagtgaagtcctcttggtaacgtagtaaccggcgtgtgac
 SerIleGluAspSerValIleSerLeuSerGlyAspHisCysIleIleGlyArgThrLeu -

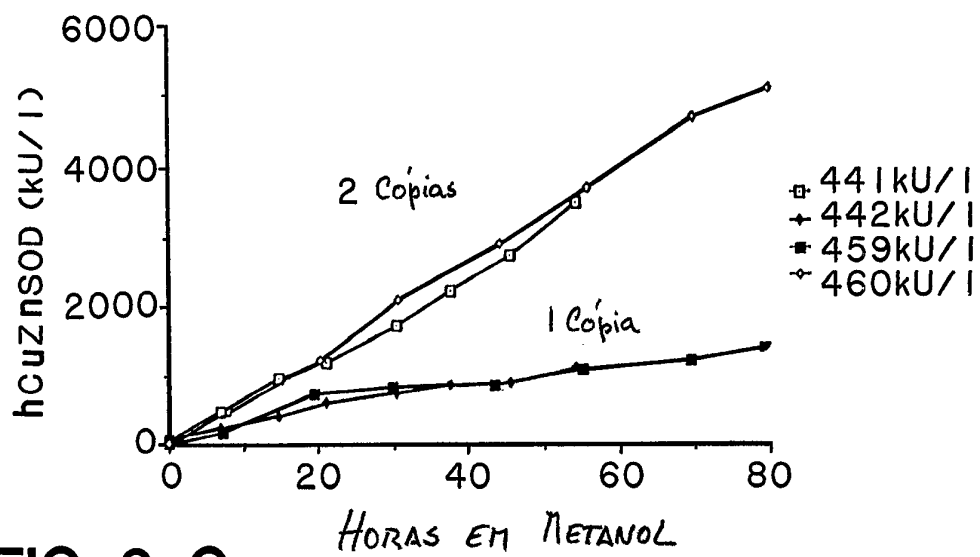
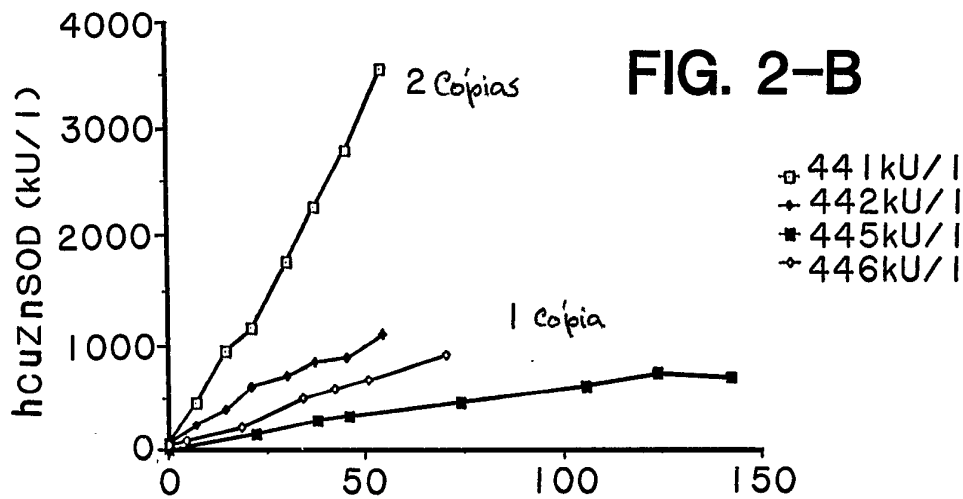
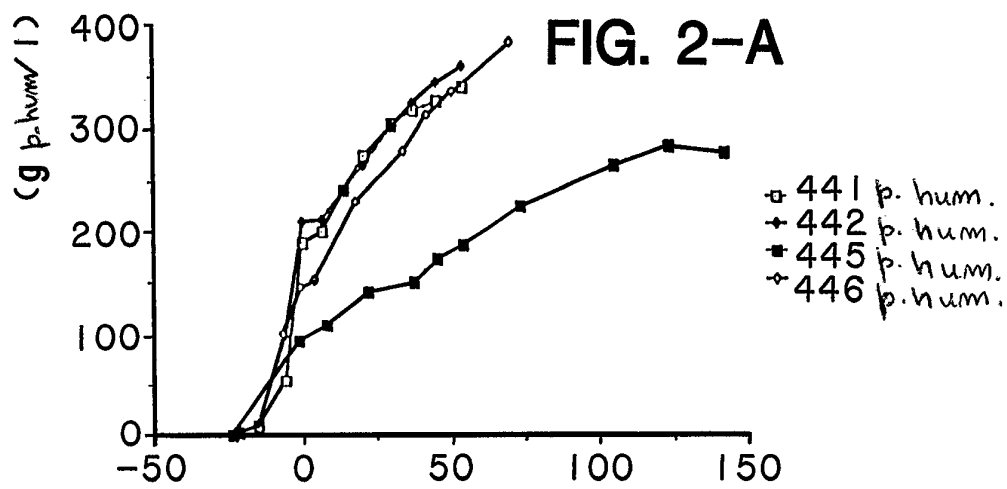
FIG. 1-3

gtgtccatgaaaagcagatgacttgggcaaaagtggaatgaagaaagtacaaagaca 420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
caccaggtaacttttcgtctactgaaccgtttccacctttacttcttcatgtttctgt
ValValHisGluLysAlaAspLeuGlyLysGlyGlyAsnGluGluSerThrLysThr -
421
ggaaacgctggaagtcgtttggccttgtggtgtaattgggatacgcccaatagtaactgcag 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
cctttgcgaccttcagcaaacccaacacacatttaaccctagcgggttattattgacgtc
GlyAsnAlaGlySerArgLeuAlaCysGlyValIleGlyIleAlaGlnEndEndLeuGln -

FIG. 1-4

5/6

Handwritten notes:
 10-1-77
 10-1-77



Ensaio da Superóxido-dismutase

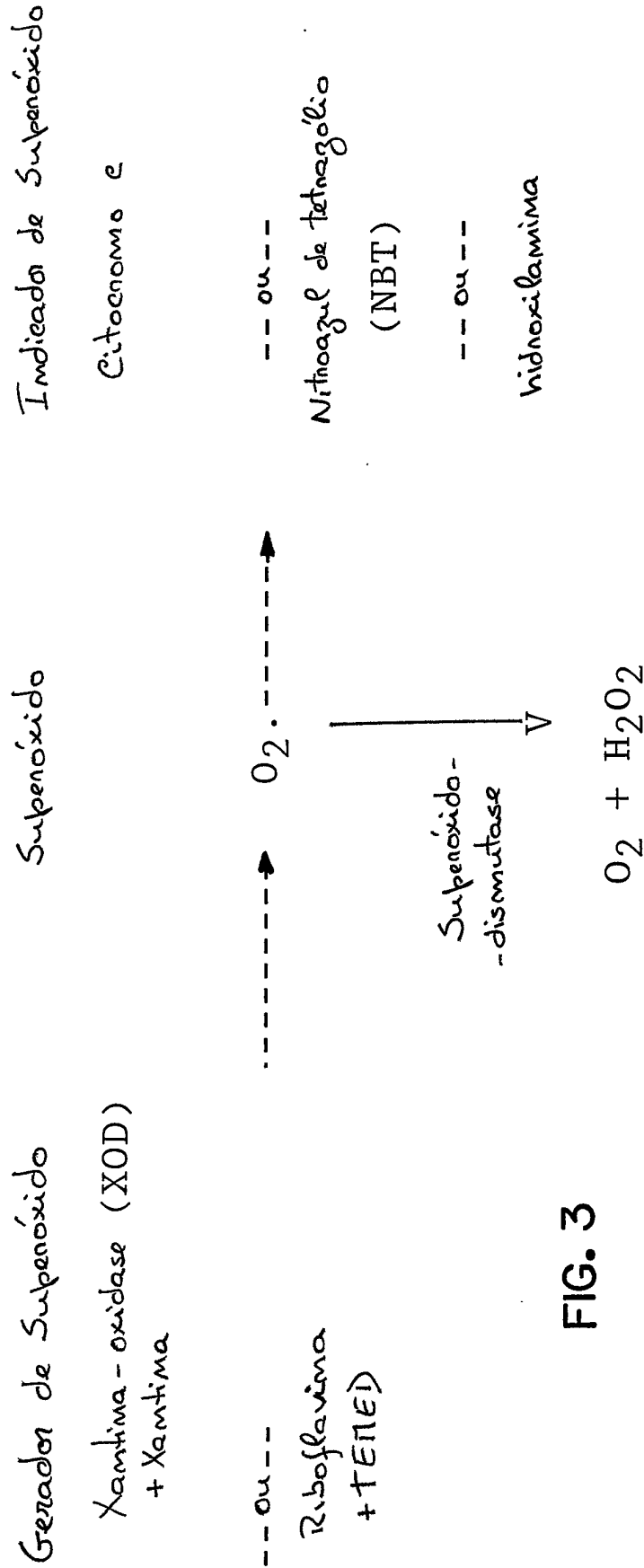


FIG. 3