



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 866848 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 1/14 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1996.11.12**

(30) Prioridade(s): **1995.12.15 US 0573020**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.09.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.02.21**
003/2007

(73) Titular(es):

UNIVERSITY OF HAWAII
2800 WOODLAWN DRIVE, SUITE 280, MANOA
INNOV.CENTER HONOLULU, HI 96822 US

(72) Inventor(es):

W. DORSEY STUART US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **HOSPEDEIROS NEUROSPORA MELHORADOS PARA A PRODUÇÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES, E MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DOS MESMOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"Hospedeiros *Neurospora* melhorados para a produção de proteínas recombinantes, e métodos para produção dos mesmos"

A presente invenção proporciona células hospedeiras melhoradas para utilização na produção de proteínas recombinantes segregadas, métodos para a preparação de hospedeiros melhorados e suas utilizações. A invenção proporciona especificamente estirpes de *Neurospora crassa* que produzem níveis reduzidos de proteases extracelulares quando comparadas com a *Neurospora crassa* de tipo selvagem.

DESCRIÇÃO

"Hospedeiros *Neurospora* melhorados para a produção de proteínas recombinantes, e métodos para produção dos mesmos"

Campo Técnico

A invenção refere-se ao campo da produção de proteínas recombinantes, especialmente proteínas eucariotas. Em particular, a presente invenção proporciona hospedeiros *Neurospora* melhorados que não degradam proteínas expressas à mesma velocidade que *Neurospora* do tipo selvagem e métodos de isolamento destes hospedeiros.

Arte Anterior

A clonagem e expressão de genes heterólogos em bactérias, leveduras e fungos, têm sido reconhecidas como sistemas potenciais para a produção de uma variedade de proteínas úteis. Por exemplo: Lambowitz, na Patente U.S. 4 486 533, revela a replicação autónoma de vectores de ADN para fungos filamentosos por ADN plasmídico mitocondrial e a introdução e expressão de genes heterólogos em *Neurospora*; Yelton et al., na Patente U.S. 4 816 405, revela ferramentas e sistemas que permitem a modificação de importantes estirpes de ascomicetos filamentosos para produzir e segregar grandes quantidades de proteínas heterólogas desejadas; Buxton et al., na Patente U.S. 4 885 249, revela a transformação de *Aspergillus niger* por um vector de ADN que contém um marcador seleccionável susceptível de ser incorporado nas células hospedeiras de *A. niger*; e McKnight et al., na Patente U.S. 4 935 349, revela um método para a expressão de genes de eucariotas superiores em *Aspergillus* envolvendo promotores capazes de dirigir a expressão de um gene heterólogo em *Aspergillus* e outros fungos filamentosos. Foram utilizadas técnicas similares para clonar o gene *mtr* envolvido no transporte de aminoácidos em *Neurospora crassa* ("*N. crassa*") e para verificar a forte ligação do ADN clonado a marcadores genómicos que flanqueiam este gene *in vivo*. Stuart, W.D. et al., *Genome* (1988) 30:198-203; Koo, K. e Stuart, W.D. *Genome* (1991) 34:644-651.

Bennett et al., (1991) *More Genetic Manipulation of Filamentous Fungi*, Orlando Florida, Academic Press,

páginas 396 a 428, revêem a expressão de genes heterólogos em fungos filamentosos.

Os fungos filamentosos possuem muitas características que os tornam bons candidatos para utilização na produção de proteínas eucariotas. Os fungos filamentosos podem segregar proteínas complexas; dobrar correctamente proteínas tridimensionais incluindo a formação de ligações dissulfureto; cortar proteoliticamente proteínas após tradução; e glicosilar proteínas utilizando reacções de glicosilação com ligação a N e com ligação a O. Estas capacidades tornaram este grupo de organismos hospedeiros atractivos para a produção de proteínas recombinantes segregadas. (MacKenzie, D.A. et al., *J Gen Microbiol* (1993) **139**:2295-2307; Peberdy, JF., *Trends in BioTechnology* (1994) **12**:50-57). Na maior parte dos casos até à data, os níveis de produção comercialmente viáveis de proteínas recombinantes (heterólogas) em fungos filamentosos não conseguem atingir os elevados níveis de produção de proteínas fúngicas naturais (homólogas). Isto foi atribuído a uma ampla variedade de potenciais causas incluindo elevados níveis de proteases segregadas.

Utilizou-se recentemente *Neurospora crassa* como célula hospedeira para a produção de proteínas recombinantes homólogas e heterólogas. (Carattoli, A., et al., *Proc Nat Acad Sci USA* (1995) **92**:6612-6616; Yamashita, R.A. et al., *Fungal Genetics Newsletter* (1995 Suppl.) **42A**; Kato, E. et al., *Fungal Genetics Newsletter* (1995 Suppl.) **42A**; Buczynski, S. et al., *Fungal Genetics Newsletter* (1995 Suppl.) **42A**). Contudo, o *Neurospora crassa* possui pelo menos 5 (cinco) proteases extracelulares distintas, três caracterizadas como proteases ácidas, pelo menos uma protease neutra e pelo menos uma protease alcalina. (Lindberg, R.A. et al., *J Bacteriol* (1982) **150**(3):1103-1108). Estas proteases são altamente expressas sob condições de privação de um ou mais nutrientes essenciais e.g., carbono, azoto, enxofre, e podem resultar num nível elevado de degradação de proteínas de uma proteína recombinante expressa. (Lindberg, R.A. et al., *J Bacteriol* (1982) **150**(3):1103-1108; Cohen, L. et al., *Archiv Biochem Biophys* (1975) **169**:324-330; Abbott, RA. et al., *J Bacteriol* (1984) **159**(2):505-510; Hanson, M.A. et al., *Proc Nat Acad Sci USA* **72**(4):1240-1244 (1975).

As células hospedeiras ideais para utilização na produção de proteínas recombinantes teriam as características de

- 1) serem de crescimento simples e pouco dispendioso em culturas laboratoriais;
- 2) serem capazes de segregar elevados níveis do produto recombinante para meios líquidos, desse modo eliminando a necessidade de romper a célula hospedeira para recuperar o produto, desse modo simplificando os protocolos de processamento a jusante;
- 3) serem capazes de dobrar, cortar, glicosilar e de outro modo processar após a tradução, o produto recombinante, de uma maneira similar ou idêntica à célula na qual o produto foi originalmente produzido na natureza;
- 4) possuírem um marcador ou marcadores genéticos para a fácil identificação de células transformadas, e;
- 5) proporcionarem um ambiente estável, não desnaturante, não degradante, nos meios de produção, de modo a que o produto recombinante possa acumular-se com segurança ao longo do tempo.

As estirpes do fungo filamentoso *Neurospora crassa* que se encontram na natureza possuem algumas, mas não todas, as características anteriores. Estas estirpes estão disponíveis em repositórios de reserva tais como o Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, Kansas. As estirpes disponíveis possuem as características de

- 1) serem de crescimento simples e pouco dispendioso em culturas laboratoriais;
- 2) serem capazes de segregar até 250 mg por litro das suas próprias proteínas endógenas e;
- 3) serem capazes de dobrar, cortar, glicosilar e de outro modo processar após a tradução, as suas próprias proteínas endógenas.
- 4) possuírem marcadores genéticos conhecidos que podem ser recuperados por transformação e que são adequados para uma

fácil identificação de células transformadas. O mais simples destes marcadores são mutações que causam uma necessidade nutricional simples e que podem ser recuperados a partir da necessidade nutricional por transformação com o gene de tipo selvagem apropriado (e.g., his-2, his-3, inl, trp-2);

5) possuírem mutações conhecidas que aumentam a taxa de secreção de algumas ou todas as proteínas endógenas extracelulares (e.g., exo-1, alelo não identificado em inl^{ts} 498).

Contudo, em nenhum lado na natureza ou em estirpes de colecção, incluindo estirpes contendo mutações induzidas em laboratório, se encontram mutações que reduzem o nível de proteases extracelulares normalmente segregadas por *Neurospora crassa* para os meios nem nenhuma estirpe ou estirpes em que todas as outras características genéticas desejáveis descritas podem ser encontradas nem são encontradas em nenhum seu subconjunto ou combinação parcial.

A presente invenção proporciona estirpes melhoradas de *Neurospora crassa*, métodos para a produção dessas estirpes, e suas utilizações, por exemplo, para utilização na expressão de produtos de proteínas recombinantes. A construção de uma estirpe específica é utilizada a título de exemplo mas esta ilustração específica do método não se pretende limitativa do âmbito da invenção.

Sumário da invenção

A presente invenção proporciona linhas de células hospedeiras *Neurospora* melhoradas para utilização na produção de proteínas recombinantes. Especificamente, a presente invenção proporciona hospedeiros *Neurospora* que possuem uma reduzida actividade de protease extracelular. Estes hospedeiros são caracterizados pela não produção de um halo sobre ágar-gelatina-sorbose (SGA) após pelo menos oito dias de incubação a 30°C e são isoladas utilizando dois ou mais ciclos de mutagénese e selecção. Verificou-se que estas estirpes produzem proteínas recombinantes segregadas com taxas multiplicativas após cada ciclo de mutagénese e selecção.

Assim, a presente invenção proporciona uma estirpe mutante de *Neurospora*, em que a estirpe mutante apresenta uma redução na actividade de protease segregada como determinado pela incapacidade da referida estirpe mutante para produzir halos após crescimento durante 8 dias a 30°C sobre placas de sorbose-ágar-gelatina (SGA).

A presente invenção proporciona ainda métodos melhorados para a produção de linhas de células hospedeiras de *Neurospora* para utilização na produção de proteínas recombinantes. Os métodos melhorados utilizam dois ou mais ciclos de mutagénese/selecção para identificar linhas de células com reduzida actividade de protease extracelular.

A invenção proporciona portanto também um método para o isolamento de uma estirpe mutante de *Neurospora* da invenção a partir de uma estirpe de *Neurospora* progenitora, o método compreendendo a utilização de dois ou mais ciclos de mutagénese e selecção para identificar a estirpe mutante de *Neurospora*, em que as células de *Neurospora* são seleccionadas após cada ciclo de mutagénese por requererem mais dias de incubação para produzir um halo sobre placas de substrato de sorbose-protease do que os requeridos pela estirpe submetida à mutagénese, onde pelo menos um dos ciclos de mutagénese e selecção é realizado após a introdução de um ADN exógeno que codifica uma proteína recombinante no hospedeiro.

Num exemplo, uma linha celular de *Neurospora* exo 1/his-3 foi mutada com luz UV e as colónias com capacidade diminuída para a produção de um halo sobre placas de SGA após quatro dias de crescimento a 30°C foram seleccionadas e submetidas a ciclos adicionais de mutagénese e selecção. Num exemplo, após três ciclos de mutagénese, verificou-se que as linhas celulares produzem de cerca de 27 a 125 vezes a quantidade de proteína recombinante segregada que a que é produzida pela estirpe de partida.

A presente invenção proporciona ainda métodos melhorados para a produção de proteínas recombinantes, consistindo a melhoria na utilização de linhas de células hospedeiras de *Neurospora* seleccionadas utilizando os métodos aqui descritos. A invenção portanto compreende um método para a produção de

uma proteína recombinante, o método compreendendo a utilização de uma estirpe mutante de *Neurospora* da invenção. Num exemplo, mostrou-se que estas estirpes produzem de cerca de 27 a 125 vezes a quantidade de proteína recombinante segregada que a que é produzida pela estirpe de partida.

Descrição Detalhada das Concretizações Preferidas

A presente invenção baseia-se na observação de que múltiplos ciclos de mutagénese e selecção podem ser utilizados para isolar estirpes de *Neurospora* que degradam proteínas recombinantes segregadas a uma taxa inferior à das estirpes de *Neurospora* de tipo selvagem e estirpes de *Neurospora* submetidas a um único ciclo de mutagénese e selecção. Num exemplo, foram produzidas estirpes que segregam proteínas recombinantes recuperáveis a uma taxa de aproximadamente 27 a 125 vezes a que é observada na estirpe de partida. Com base nesta observação, a presente invenção proporciona métodos de isolamento de linhas de células hospedeiras de *Neurospora* melhoradas que podem ser utilizadas para a produção comercial de proteínas e linhas de células hospedeiras de *Neurospora* melhoradas, isoladas pelo método revelado. Em detalhe, uma linha hospedeira de *Neurospora* melhorada possuindo uma reduzida capacidade de degradar proteínas recombinantes segregadas, pode ser isolada por mutagénese de uma estirpe de *Neurospora*, selecção de colónias clonais que possuem reduzida actividade de protease segregada, e depois repetição do processo de mutagénese/selecção um ou mais ciclos.

Tal como aqui se utiliza, uma estirpe de *Neurospora* refere-se a fungos filamentosos do género *Neurospora*. Os exemplos de espécies de *Neurospora* que podem ser modificadas como aqui descrito incluem, mas não se lhes limitam, *Neurospora crassa*, *N. africana*, *N. celata*, *N. discreta*, *N. dodgei*, *N. galapagosensis*, *N. intermedia*, *N. lineolata*, *N. pannonica*, *N. sitophila*, *N. sublineolata*, *N. terricola* e *N. tetraserma*.

Qualquer estirpe de *Neurospora* pode ser utilizada como material de partida para o presente método. As estirpes adequadas estão disponíveis em Fungal Genetics Stock Center (FGSC), Department of Microbiology, University of Kansas

Medical Center, Kansas City, Kansas 66103, ou na American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852. A estirpe de partida preferida será portadora de uma mutação auxotrófica nutricional que pode ser corrigida por um único gene. Uma mutação auxotrófica complementável proporciona um marcador seleccionável para utilização em transformação do hospedeiro gerado. Nos Exemplos que se seguem, utilizou-se uma estirpe auxotrófica para histidina como material de partida. A estirpe continha uma mutação his-3 que é prontamente complementável com um gene his-3 de tipo selvagem clonado. É proporcionada adiante uma discussão de vários marcadores seleccionáveis.

Pode-se utilizar uma variedade de métodos para mutar a estirpe de *Neurospora* de partida para produzir um hospedeiro com capacidades melhoradas de produção de proteínas. As mutações podem ser feitas utilizando métodos não dirigidos ou dirigidos. Uma mutação diz-se não dirigida quando o método de mutagénese empregue não tem como alvo uma sequência génica ou uma localização cromossómica específicas. Os procedimentos de mutagénese não dirigida que podem ser utilizados para produzir hospedeiros de *Neurospora* melhorados incluem, métodos de mutagénese químicos e físicos, e suas combinações. Os exemplos de métodos de mutagénese físicos incluem, mas não se lhes limitam, irradiação com UV, Davis et al., *Methods of Enzymology* **17A**: 79-143 (1971). Nos Exemplos que se seguem, os *Neurospora* foram mutados utilizando irradiação com ultravioleta. Um perito na especialidade pode prontamente notar que os métodos de modificação físicos podem ser melhorados utilizando agentes químicos de sensibilização. Os exemplos de agentes químicos para utilização em mutagénese não dirigida incluem, mas não se lhes limitam, EMS.

A mutagénese diz-se dirigida quando o método de mutagénese é dirigido a uma sequência alvo ou a uma região alvo específicas. Os métodos de mutagénese dirigida incluem, mas não se lhes limitam, mutagénese dirigida ao local *in vitro*, técnicas de recombinação homóloga e a utilização de elementos transponíveis. Um perito na especialidade pode prontamente adaptar procedimentos de mutagénese por *knockout* para atingir selectivamente genes envolvidos na produção de proteases segregadas. Muitos dos genes envolvidos na produção

de proteases segregadas foram clonados em *Neurospora*. Podem-se utilizar dois ou mais ciclos de mutagénese por *knockout* para produzir o hospedeiro melhorado da presente invenção. Adicionalmente, podem-se utilizar combinações de mutagénese dirigida e não dirigida.

Os métodos de mutagénese preferidos são os métodos não dirigidos. Estes métodos permitem gerar aleatoriamente múltiplas mutações num ou mais dos genes responsáveis pela produção e secreção de proteases activas sem necessidade de conhecer a identidade ou a localização cromossómica do(s) gene(s) mutado(s). Adicionalmente, a mutagénese não dirigida permite pesquisar eficientemente grandes números de populações clonais individuais de *Neurospora* mutados.

Na presente invenção, as estirpes de *Neurospora* são mutadas para produzir uma estirpe hospedeira que possui níveis reduzidos de actividade de proteases segregadas quando comparada com estirpes de tipo selvagem. Uma redução na actividade de proteases segregadas pode ser o resultado de: mutações num gene de protease, eliminação ou redução da actividade de uma protease particular, por exemplo gerando uma mutação pontual ou de desvio de enquadramento no interior da região de codificação ou reguladora da protease; alterações em vias que conduzem à secreção da protease; por exemplo mutações em genes responsáveis pelo transporte da protease; e alterações nas vias responsáveis pela indução da expressão da protease.

Podem-se utilizar uma variedade de métodos para identificar estirpes em que o método de mutagénese empregue resulta na redução de proteases exógenas. O método de selecção preferido assenta na capacidade de *Neurospora* para degradar um substrato de proteína extracelular.

O *Neurospora* de tipo selvagem crescido em meios sólidos contendo sorbose e um substrato de proteína-protease opaco, por exemplo placas de sorbose-ágar-gelatina (SGA), cresce na forma de colónias e produz um halo circundante da colónia em crescimento (uma zona clara). O halo surge um a quatro dias depois do plaqueamentos e representa a degradação de proteínas extracelulares por proteases segregadas. Após um ciclo de

mutagénese, o *Neurospora* contendo mutações que alteram a actividade de proteases segregadas será identificável quer pela ausência destes halos, quer por ter menores halos presentes, após quatro dias de incubação. Após um ou mais ciclos adicionais de mutagénese e selecção, podem ser identificadas estirpes que não têm estes halos, ou que têm halos menores presentes, após oito dias de incubação. Todos os hospedeiros melhorados da presente invenção serão prontamente identificáveis pela ausência de produção de um halo após crescimento durante 8 dias a 30°C sobre placas de sorbose-ágar-gelatina.

Antes da presente invenção, não havia uma descrição de uma estirpe de *Neurospora* que não produz um halo após oito dias de cultura. As estirpes isoladas após três ciclos de mutagénese/selecção produzirão aumentos multiplicativos de produção de proteínas quando comparadas com a estirpe de partida. As estirpes que produzem 20, 30, 60, 90, 120 e até 125 vezes a proteína segregada recuperável, podem ser isoladas após três ciclos de mutagénese.

Podem ser empregues uma variedade de meios de plaqueamento para seleccionar as estirpes hospedeiras melhoradas da presente invenção. Um componente essencial dos meios é a sorbose. A sorbose permite que os *Neurospora* cresçam na forma de colónias individuais quando plaqueados em meios sólidos.

Os meios de plaqueamento podem adicionalmente conter um substrato de protease que é ligeiramente a muito opaco. Os exemplos destes substratos de protease incluem, mas não se lhes limitam, ágar de gelatina, albumina, sólidos de leite desnatado, caseína e citocromo c.

Os meios preferidos conterão uma baixa quantidade de um nutriente essencial, por exemplo carbono, azoto ou enxofre, ou conterão um ou mais destes componentes numa forma que necessite de ser degradada antes de poder entrar (ser transportada) numa célula de *Neurospora*. Mostrou-se que estes meios aumentam a produção/actividade de proteases segregadas a partir de *Neurospora*, Abbott, R.A. et al., *J Bacteriol* (1984)

159(2):505-510; Hanson, M.A. *et al.*, *Proc Nat Acad Sci USA* **72(4)**:1240-1244 (1975).

O pH dos meios pode também ser variado como um meio para identificar mutações dentro de classes específicas de proteases. As proteases podem ser classificadas de acordo com o pH necessário para a actividade, por exemplo, proteases ácidas, básicas e neutras. Por plaqueamento de *Neurospora* mutados em meios com um pH particular, podem ser identificadas as mutações que afectam essa classe de proteases.

O método de plaqueamento/selecção utilizado nos exemplos que se seguem permite pesquisar um grande número de colónias clonais após a mutagénese. Podem ser utilizados métodos alternativos para identificar os hospedeiros melhorados da presente invenção. Por exemplo, ensaios que detectam directamente a presença de proteases segregadas, podem ser utilizados para identificar hospedeiros *Neurospora* da presente invenção. A actividade de protease pode ser directamente ensaiada a partir de sobrenadantes de culturas utilizando métodos descritos na especialidade. Alternativamente, a presença de uma protease particular pode ser determinada utilizando ensaios imunológicos, tais como um ensaio ELISA.

Nos presentes métodos, utilizam-se dois ou mais ciclos de mutagénese. Observou-se que são necessários dois ou mais ciclos de mutagénese para identificar linhas de células hospedeiras que não produzem halos após oito dias de cultura a 30°C sobre placas de SGA. Esta selecção identifica estirpes com aumentos multiplicativos na produção de proteína segregada recuperável em comparação com estirpes de partida. Numa aplicação do presente método, a estirpe é isolada utilizando dois ou mais ciclos de mutagénese/selecção antes de introduzir um ADN exógeno na célula para utilização na produção de uma proteína heteróloga. Alternativamente, utiliza-se um único ciclo de mutagénese/selecção antes de introduzir um ADN exógeno na célula e depois são realizados um ou mais ciclos adicionais de mutagénese/selecção após a introdução do ADN exógeno.

Uma vez isolado, o hospedeiro *Neurospora* melhorado da presente invenção podem ser utilizado para produzir proteínas

recombinantes. A produção de proteínas será significativamente aumentada devido à redução de actividade de proteases segregadas quando comparada com estirpes de tipo selvagem.

As técnicas *standard* para a transformação de fungos filamentosos e cultura dos fungos são bem conhecidas na especialidade e podem ser utilizadas para transformar os hospedeiros melhorados da presente invenção para a produção de proteínas recombinantes. Uma revisão extensiva de técnicas, enquanto aplicadas a *N. crassa*, é encontrada, por exemplo em Davis *et al.*, *Methods Enzymol* (1971) **17A**:79-143. São geralmente utilizados procedimentos *standard* para a manutenção de estirpes e preparação de conídios. Os micélios crescem tipicamente em culturas líquidas durante cerca de 14 horas (25°C), como descrito em Lambowitz *et al.*, *J Cell Biol* (1979) **82**: 17-31. As estirpes hospedeiras podem crescer geralmente em meio mínimo de Vogel ou Fries suplementado com o(s) nutriente(s) apropriado(s), tais como, por exemplo, histidina; arginina; phe, tyr e/ou trp (cada um a cerca de 80µg/ml); ácido p-aminobenzóico (cerca de 2 µg por ml); e inositol (cerca de 0,2 mg por ml).

Quando a expressão foi activada e a proteína desejada produzida, a proteína pode ser recuperada a partir da cultura utilizando técnicas geralmente reconhecidas na especialidade. Como a proteína é segregada para o meio, o meio pode ser removido e a proteína segregada purificada utilizando técnicas convencionais tais como cromatografia de exclusão por tamanhos, de permuta iónica, cromatografia de fase inversa, centrifugação diferencial, e semelhantes. Os protocolos adequados dependerão da natureza da proteína produto.

O hospedeiro melhorado da presente invenção destina-se a utilização na produção de uma proteína recombinante segregada. Para auxiliar nesta utilização, a estirpe de partida pode conter um marcador auxotrófico que possa ser complementado por um único gene ou pode ser empregue um agente marcador seleccionável/de selecção. A escolha apropriada do marcador seleccionável dependerá da natureza da proteína que vai ser produzida e da natureza da estirpe de partida. Uma escolha directa poderá ser, por exemplo, um sistema de expressão que produz uma enzima responsável por uma resistência a

antibiótico contra um antibiótico ao qual o hospedeiro é susceptível, tal como benomilo. Alternativamente, se for escolhido um hospedeiro com, por exemplo, uma deficiência nutricional, um gene de tipo selvagem pode ser utilizado para substituir a deficiência. Para isto, contudo, é necessário um mutante adequado.

Embora uma estirpe de partida possa ser preparada genericamente, estão prontamente disponíveis numerosos mutantes de *Neurospora* que tornam mais diverso o desenho de vectores de transformação contendo meios para selecção. Por exemplo, um método muito simples para a selecção utiliza uma estirpe com uma necessidade para um nutriente particular onde os meios marcadores seleccionáveis são proporcionados substituindo o gene defectivo responsável por esta necessidade nutricional. A título de ilustração, se for utilizada uma estirpe incapaz de crescer na ausência de histidina como estirpe de partida, os transformantes bem sucedidos podem ser seleccionados utilizando como "marcador" ácido nucleico contendo o tipo selvagem do gene que é defectivo no mutante e crescendo as células transformadas em meios mínimos. Apenas os transformantes bem sucedidos serão capazes de crescer na ausência de histidina. Mutações similares que resultam em dependência da presença de outros aminoácidos ou outros nutrientes nos meios são também conhecida. Em *N. crassa*, por exemplo, mutantes conhecidos incluem mutantes que possuem necessidades nutricionais específicas. Os exemplos de necessidades de nutrientes úteis e os mutantes relevantes incluem:

(1) aminoácidos tais como histidina (mutantes his-1 a -7), prolina (mutantes aga), arginina (mutantes arg-11), citrulina (mutantes arg-11), asparagina (mutantes asn), colina (mutantes chol-1 e chol-2), cisteína (mutantes cys-1), glutamina (mutantes gln-1), leucina (leu-1 a -4), lisina (lys-2, -4 e -5), metionina (mutantes mac e mutantes met-6, -9 e -10), e treonina (mutantes thr-2 e -3);

(2) misturas de aminoácidos aromáticos, tal como uma mistura de ácido p-aminobenzóico, tirosina, triptofano e fenilalanina (requeridos por todas as estirpes aro excepto aro-6, aro-7 e aro-8), uma mistura de triptofano e fenilalanina (requeridos para todos os mutantes aro-6), uma mistura de isoleucina e

valina (requeridas para *ilv-1*, *-2* e *-3*), e uma mistura de fenilalanina e tirosina (requeridas para mutantes *pt*).

(3) vitaminas tais como ácido pantoténico (mutantes *pan-1*) e tiamina (mutantes *thi-2* e *thi-4*);

(4) bases púricas tais como adenina (mutantes *ad-2* a *ad-4* e *ad-8*), hipoxantina (mutantes *ad-2* e *ad-3*), inosina e guanina ou guanosina (mutantes *gua-1* ou *-2*);

(5) bases pirimídicas tais como uracilo (*pyr-1* a *pyr-6*);

(6) ácidos gordos saturados (mutantes *cel*) ou ácidos gordos insaturados tais como ácidos gordos C_{16} ou C_{18} possuindo uma ligação dupla na conformação *cis* quer na posição 9 quer na 11, ácidos gordos com uma ligação dupla na configuração *trans* na posição 9, e ácidos gordos com múltiplas ligações duplas *cis* interrompidas por pontes de metileno (*ufa-1* e *-2*);

(7) iões fisiologicamente importantes tais como potássio (*trk*);

(8) aldóis tais como inositol (mutantes *acu* e mutantes *inl*) e glicerol; e

(9) outras entidades orgânicas tais como acetato (mutantes *ace*), I-cetoglutarato, succinato, malato, formiato ou formaldeído (mutantes *for*), ácido p-aminobenzóico (mutantes *pab-1*, *-2* e *-3*), e sulfonamida (mutantes *sfo* a 35°C).

Podem também ser utilizados outros sistemas marcadores seleccionáveis, tais como a inclusão de genes que conferem resistência a substâncias tóxicas ou outras condições de cultura prejudiciais. Por exemplo, podem ser utilizados genes que codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos quando a selecção é conduzida em meios contendo o antibiótico. No caso de fungos filamentosos, estes antibióticos incluem benomilo.

A presente invenção proporciona ainda um hospedeiro isolado pelos métodos aqui descritos. Um exemplo de um hospedeiro isolado com os presentes métodos é denominado Hep-25/24 e foi depositado na American Type Culture Collection

em 14 de Dezembro de 1995, segundo os termos do Tratado de Budapeste. A produção do hospedeiro Hep-25/24 é descrita em detalhe nos exemplos.

Os exemplos que se seguem destinam-se a ilustrar, mas não limitar, a invenção.

Exemplo 1

Métodos e Materiais

Todas as estirpes de partida foram obtidas no Fungal Genetics Stock Center (FGSC), Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas 66103. As estirpes estão identificadas pelo nome do seu *locus* e número de reserva FGSC conforme enumerado no "Catalog of Strains" disponível no Stock Center.

Todas as técnicas para o crescimento, acasalamento e recuperação da progénie de culturas de *Neurospora* seguem métodos bem estabelecidos que estão bem descritos em "Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*" por R.H. Davis, e F.J. DeSerres, *Methods in Enzymology* Volume 17A, 79-143, 1970.

As técnicas específicas para a identificação de produtos recombinantes utilizam ensaios *standard* desenvolvidos para cada produto particular. Estas incluem, mas não se lhes limitam, ensaios imunossorventes com enzima ligada (ELISA) *standard* e ensaios de actividade.

Descrição da construção de uma estirpe de expressão de *Neurospora crassa*:

Cruzamentos genéticos

A estirpe *exo-1* (FGSC# 2256) é um super-produtor de enzimas extracelulares incluindo amilase e invertase (H. Gratzner e D.N. Sheehan, *J. Bact* **97**: p544-549, 1969). A estirpe *his-3* (FGSC#2278) requer suplementação com histidina no meio devido a uma mutação num gene complexo que codifica para múltiplas actividades enzimáticas na via biossintética da

histidina de *Neurospora* (D.D. Perkins, et al., *Microbiological Reviews*, 46: p426-570, 1982).

A estirpe exo-1 foi cruzada com a estirpe his-3 e recuperou-se a progénie mutante dupla exo-1; his-3. Esta progénie foi designada hisexo e recuperaram-se exemplos de ambos os tipos de acasalamento de *Neurospora*, A e a.

Um isolado, denominado hisexo-Ia, foi crescido em meios sólidos que se sabe induzirem a produção de protease extracelular (Lindberg, R.A., et al., *J. Biol Chem* **256**(2):811-814 (1981). Esta estirpe produziu halos visíveis em placas de sorbose-ágar-gelatina após quatro dias de crescimento a 30°C.

Mutagénese da estirpe hospedeira

A mutagénese da estirpe hisexo-Ia foi realizada por exposição de uma suspensão de conidiaforos obtidos a partir de uma cultura em rampa sólida de hisexo-Ia a uma fonte de luz Ultravioleta (W Crosslinker, FB-UVX-1000 Fisher Scientific) durante um tempo suficiente (20 segundos) para obter 60-80% de morte a partir da exposição a UV. As células sobreviventes foram plaqueadas sobre meios sólidos de indução de protease em placas de Petri *standard* a uma diluição calculada para originar 50-100 colónias por placa. As colónias resultantes foram classificadas após 4 dias de crescimento. As colónias sem halos visíveis foram repicadas e transferidas para rampas de ágar de meio mínimo de Vogel (Davis e DeSerres) para testes adicionais. Aproximadamente 20 000 colónias foram classificadas e 67 foram seleccionadas para testes adicionais. Uma colónia seleccionada originou um fenótipo estável e reprodutível sem halo no dia 4 e foi designada Hep-25 (histidina-exo protease extracelular). As colónias de Hep-25 desenvolveram halos visíveis quando deixadas crescer durante 8 dias.

Realizou-se um segundo ciclo de mutagénese como descrito atrás, utilizando Hep-25 como estirpe de partida e classificando as colónias resultantes que não têm halos após 8 dias. Novamente, foram classificadas aproximadamente 20 000 colónias e 52 foram seleccionadas para estudos

adicionais. Uma destas originou um fenótipo estável e reprodutível e foi designada Hep-25/24.

Seleção de transformantes que produzem uma proteína recombinante

Transformou-se Hep-25/24 através de métodos *standard* (Vollmer, S.J. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:4869-4873(1986)) com uma amostra de ADN contendo o plasmídeo pNH60 (obtido de FGSC) contendo a sequência do gene *his-3* do tipo selvagem e um plasmídeo contendo um vector de expressão de *Neurospora* conduzido pelo promotor da ARN-polimerase do gene da glucoamilase de *Neurospora* (Pedido de Patente PTC Pendente, Alan Radford e University of Leeds, Reino Unido), contendo um gene de ADNc que codifica para a subunidade da cadeia capa humana de imunoglobulina G (IgG) humana incluindo o terminal amino que codifica para o local de reconhecimento da partícula de reconhecimento do sinal e sinal de secreção e terminada pelo local de paragem da transcrição da glucoamilase e o local de poliadenilação (Radford *op cite*). Seleccionaram-se os transformantes por crescimento de colónias em meio mínimo sólido suplementado com sorbose mas sem um suplemento de histidina.

Repicaram-se as colónias de células transformadas com pipetas descartáveis de vidro estéreis, transferiram-se para placas de microtítulo estéreis contendo filtros de 0,45 μ no fundo do poço (Millipore) coberto por um filme de plástico estéril para evitar perdas e cresceu-se em meio líquido de Vogel (Davis e DeSerres *op cite*) suplementado com 2% de sorbose a 30°C com agitação a 150 rpm. Após 48 horas removeu-se o filme de plástico e empurraram-se os meios através dos filtros do fundo e recolheram-se para uma placa de microtítulo *standard* utilizando um dispositivo desenhado para esta recolha (Millipore). A placa contendo as células foi armazenada a 4°C enquanto os meios foram ensaiados quanto à presença de proteína da cadeia capa humana através de um ELISA em sanduíche.

As culturas identificadas pelo ensaio como produtoras de níveis elevados de proteína capa no meio foram transferidas da placa de microtítulo de cultura para rampas de ágar sólido. Em

muitas séries de experiências em paralelo, a percentagem de colónias transformadas que também produzem a proteína recombinante variou de 10-30% de todos os transformantes repicados. Como prática geral, transferiram-se usualmente as seis maiores culturas para estudos posteriores. Os grandes produtores estáveis são então passados através de uma etapa de crescimento de microconídios para assegurar núcleos homocarióticos na estirpe de produção (Ebbole, D. et al., *Fungal Genetics Newsletter* **37**:17-18 (1990)). Subculturas microconidiais foram repicadas a partir de meios de colónias em placas de Petri e transferidas para um novo conjunto de placas de microtítulo de cultura com filtros no fundo e cresceram-se e testaram-se como descrito atrás para o procedimento de selecção original. As colónias produtoras da maior quantidade de produto recombinante (neste exemplo a cadeia capa humana como identificado por ELISA) foram transferidas para meios sólidos mínimos em tubos de rampas.

Mutagénese e selecção de estirpes super-produtoras

As estirpes com microconídios que se provaram produtores estáveis foram submetidas a um ciclo adicional do protocolo de mutagénese e plaqueadas em meio sólido mínimo para colónias. Neste protocolo as colónias que surgiram após 2-3 dias foram repicadas para placas de microtítulo de crescimento/filtro e após 2 dias de crescimento foram seleccionadas quanto a produção aumentada da proteína recombinante (neste caso a cadeia capa humana como identificado por ELISA). Entre 1 e 2% de todas as colónias examinadas exibiam produção aumentada. Os 6 maiores produtores foram testados quanto a estabilidade de níveis de produção em culturas líquidas de agitação de 25 ml. O maior produtor estável foi seleccionado como estirpe progenitora para um segundo ciclo de mutagénese e selecção como atrás descrito.

As experiências foram realizadas utilizando três ciclos deste procedimento de selecção. Verificou-se que em cada nível, uma melhoria de 3-5 vezes nos níveis de produção é típica para os mutantes de maior produção. Estas melhorias não são aditivas mas sim multiplicativas de modo que após três ciclos de mutação e selecção, o aumento nos níveis de produção de proteína recombinante varia rotineiramente de 27 a

125 vezes. Não foi atingido um limite superior de melhoria de produção possível com este método embora este deva claramente existir pois o número e o tipo de genes que controlam a produção e a secreção de proteases e proteínas recombinantes tem que ser limitado pelo tamanho e complexidade do genoma do *Neurospora*.

Utilização das estirpes desenvolvidas como hospedeiros de expressão genéricos

As estirpes desenvolvidas pelos métodos atrás descritos podem ser utilizadas como hospedeiros para proteínas recombinantes outras que não a proteína recombinante original utilizada no procedimento de selecção. Isto pode ser realizado do seguinte modo.

Se o ADN de transformação para o locus *his-3* (ou outro selectivo) na linha celular transformada original for direccionado especificamente para esse locus utilizando métodos *standard* de transformação, apenas uma sequência parcial do gene marcador (*i.e.* *his-3*) mas uma sequência parcial que cobre o local de mutação genómica no gene marcador, então a célula transformada provavelmente é portadora apenas de uma sequência do gene marcador intacta, funcional, recombinante. Similarmente, se a cassette de expressão do gene de ADNC recombinante for flanqueada por sequências longas de ADN genómico de *Neurospora*, a inserção da cassette de expressão muito provavelmente ocorrerá na forma de um único evento no local do ADN que flanqueia o gene recombinante. Ambas estas possibilidades são facilmente verificadas por transferências de *Southern* simples do ADN genómico do transformante inicial utilizando o ADN marcador e o da cassette de expressão como sondas. Se a sequência de ADN flanqueadora for cuidadosamente escolhida de modo a que a inserção cause mutagénese de um gene não essencial mas seleccionável, (*e.g.*, *am* (nitrito-redutase) ou *mtr* (transporte de aminoácidos neutros) ou *caf* (resistência a cafeína) para mencionar apenas três dos muitos potenciais locais (veja-se Perkins *et al. op cit*)) então a inserção pode ser seleccionada como uma perda de função do gene da sequência flanqueadora.

As estirpes hospedeiras modificadas com as características anteriores podem então ser co-transformadas com uma mistura de ADN contendo a sequência plasmídica do gene marcador (e.g., his-3) que foi construída para transportar uma pequena deleção interna na região de codificação que portanto codifica para um polipéptido não funcional e a sequência de ADN genómico do tipo selvagem no locus da sequência flanqueadora em torno da sequência da cassette de expressão do gene de ADNc original (e.g., cadeia capa humana).

Os transformantes serão primeiro seleccionados quanto ao restabelecimento do fenótipo da sequência do gene flanqueador (i.e. reversão para am+) quando crescidos em meios suplementados com histidina, e depois testados quanto à perda da função his-3 do tipo selvagem por teste quanto a perda da capacidade de crescer em meios não suplementados com histidina e finalmente, testados quanto à perda da capacidade de produzir o produto recombinante original. Seria de esperar que um tal transformante fosse idêntico à estirpe da célula hospedeira modificada excepto que agora perdeu mais uma vez o seu gene marcador de tipo selvagem (e.g., his-3) e substituiu a construção de expressão de ADNc contendo a sequência da proteína recombinante original (cadeia capa humana) com uma sequência genómica de ADN de *Neurospora* de tipo selvagem normal. Mais uma vez se verifica esta expectativa por transferências de *Southern* utilizando as sondas de ADN apropriadas.

Esta nova célula hospedeira está agora pronta para ser transformada com uma segunda construção de expressão de ADNc similar à primeira descrita nesta ilustração mas contendo uma sequência de ADNc diferente para expressão (e.g., anticorpo de cadeia gama humana, tPA humano, insulina humana, etc.). Mais uma vez, os transformantes iniciais podem ser pesquisados por selecção quanto à co-transformação com uma sequência marcadora de tipo selvagem funcional (e.g., his-3) como originalmente descrito atrás.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Estirpe de *Neurospora* mutante, em que a estirpe mutante apresenta uma redução na actividade de protease segregada como determinado pela incapacidade da referida estirpe mutante para produzir halos após crescimento durante 8 dias a 30°C em placas de sorbose-ágar-gelatina (SGA).

2. Estirpe mutante de acordo com a reivindicação 1, em que a estirpe mutante possui um genótipo *exo-1* e uma necessidade de aminoácidos para crescimento.

3. Estirpe mutante de acordo com a reivindicação 2, em que a necessidade de aminoácidos é de histidina.

4. Estirpe mutante de acordo com a reivindicação 3, em que o genótipo compreende um genótipo *his-3*.

5. Método para a produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo a utilização de uma estirpe de *Neurospora* mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores.

6. Método para isolamento de uma estirpe de *Neurospora* mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o método compreendendo a utilização de dois ou mais ciclos de mutagénese e selecção para identificar a estirpe de *Neurospora* mutante, em que as células de *Neurospora* são seleccionadas após cada ciclo de mutagénese por requererem mais dias de incubação para produzir um halo sobre placas de substrato de sorbose-protease do que são requeridos pela estirpe submetida à mutagénese, em que pelo menos um dos ciclos de mutagénese e selecção é realizado após a introdução no hospedeiro de um ADN exógeno que codifica uma proteína recombinante.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que se utiliza mutagénese não dirigida.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que se utiliza luz UV para a mutagénese não dirigida.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, em que são realizados três ciclos de mutagénese.

Lisboa,