

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

**N.º** 85 546

**REQUERENTE:** SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION, norte-americana (Estado de Pennsylvania), com sede em One Franklin Plaza, Philadelphia, Pennsylvania 19103, Estados Unidos da América

**EPÍGRAFE:** "Processo de preparação de inibidores proteicos de proteases"

**INVENTORES:** Thomas Rodney Berka, James Allan Fornwald, Joselina Gatmaitan Gorniak, Martin Rosenberg, James Edward Strickler e Dean Perron Taylor

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

Estados Unidos da América em 18 de Agosto de 1986 sob o nº 897.245

66 608  
SKB CASE 14324-1

PATENTE Nº. 85 546

"Processo de preparação de inibidores  
proteicos de proteases"

para que

SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION, pre-  
tende obter privilégio de invenção  
em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de prepara-  
ção de um polipeptídeo em Streptomyces que compreende:

a ligação de um fragmento de ADN que codifica para o  
polipeptídeo com a unidade de expressão genética LEP-10 ou  
LTI, ou com uma sua parte, para preparar uma molécula de ADN  
recombinante;

a transformação de organismos de Streptomyces com a  
molécula de ADN recombinante; e

a cultura dos Streptomyces transformados por forma a  
que seja expresso o polipeptídeo.

Estes inibidores de protease são úteis em processos  
com ADN recombinante.



-2-

## MEMÓRIA DESCRITIVA

### Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao processo de preparação de inibidores microbianos de proteases e, especificamente, ao processo de preparação de inibidores proteicos de proteases produzidos por Streptomyces, que estão estruturalmente relacionados com Inibidor da Subtilisina de Streptomyces e aos seus genes clonados e suas utilizações em processos com ADN recombinante.

### Antecedentes da invenção

Os inibidores proteicos de proteases parecem desempenhar um papel importante na regulação das funções protease em organismos e células vivos. Estes inibidores de protease encontram-se largamente distribuídos em animais e plantas. Exemplos destes inibidores são a alfa-1-antiprotease, o inibidor da tripsina de soja, o inibidor da tripsina de pâncreas bovino e a antitrombina. Os inibidores proteicos de protease produzidos microbianamente incluem uma família de proteínas dimericas, cada uma com 10 a 12 kilodaltons (kd). Esta família inclui o SSI, o inibidor alcalino de protease (API-2) a partir de S. griseoincarnatus, plasminoestreptina (PSN) a partir do S. antifibrinolyticus e um inibidor de protease a partir do Streptoverticillium cinnamoneum. Os inibidores da família SSI partilham uma homologia de sequência extensiva, p.e., cerca de 70% entre o SSI e PSN, mas parecem ter especificidades de proteases diferentes. Ver geralmente, "Protein Protease Inhibitors - The Case of Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI)", publicado por Hiromi et al., Elsevier, 1985, páginas 1-14, 139-161 e 365-395. Kakinuma et al., Patente dos Estados Unidos 4 014 860, descreve o PSN e uma estirpe sua produtora.

Os inibidores proteicos de protease têm aplicação médica p.e. no tratamento da degradação do tecido pulmonar provocada por deficiência de alfa-1-antiprotease. Os inibidores

-3-

proteicos de protease podem também ser usados para evitar a degradação de proteínas provocada por proteases tais como as que estão presentes no soro. Wilson, Pedido de Patente Europeia nº. 113 319, refere o uso de inibidor de tripsina Erythrina para inibir a conversão de um activador de plasminogénio de tecido de cadeia simples, na forma de cadeia dupla que ocorre na presença de soro.

Os Streptomyces são hospedeiros atractivos para a preparação dos poliptídeos desejados por técnicas de ADN recombinante em virtude de possuírem a "maquinaria" celular necessária para exportar proteínas e em virtude de ter já sido adquirida uma grande experiência na cultura de Streptomyces para a produção de antibióticos.

Um problema que tem sido encontrado na preparação de proteínas heterólogas em Streptomyces é o da degradação da proteína por proteases endógenas. Um segundo problema que tem sido encontrado reside na obtenção de sequências de sinal de exportação que possam ser fundidas com as sequências de codificação heterólogas, para exportar directamente os produtos genéticos heterólogos.

Além disso, é desejável obter regiões reguladoras, p. e., promotores, centros de ligação de ribossomas e sequências de transcrição de intensificação/estabilização que possam ser usadas para exprimir as sequências de codificação heterólogas em Streptomyces a altos níveis. Estes produtos estão tipicamente associados com a produção de ARN-m abundante e/ou de produtos genéticos.

Brawner et al., Pedido de Patente Europeia nº. A-187630 descreve uma unidade de expressão genética de beta-galactosidase em Streptomyces e a utilização do seu promotor e da sua sequência de sinal de exportação para exprimir e exportar produtos genéticos heterólogos.

Um dos objectivos do presente invento consiste em proporcionar novos inibidores proteicos de proteases a partir de Streptomyces. Um outro objectivo do presente invento consiste

-4-

no processo de preparação de pequenas proteínas exportadas que são produzidas em quantidades abundantes, e das suas sequências de codificação de ADN, sinais de exportação e regiões reguladoras.

#### Sumário da invenção

A presente invenção refere-se ao processo de preparação de novos inibidores proteicos de protease seleccionados do grupo consistindo da Proteína Exportada Lividans (10 kd) (LEP-10) e do Inibidor de Tripsina Longisporus (LTI).

Sob outras perspectivas, o presente invento refere-se ao processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante compreendendo

- (i) a unidade de expressão genética LEP-10 ou LTI,
- (ii) a sequência de codificação de LEP-10 ou de LTI,
- (iii) a região reguladora de LEP-10 ou de LTI,
- (iv) a sequência de sinal de exportação de LEP-10 ou de LTI, ou
- (v) uma sequência de codificação híbrida, fundida com uma sequência de codificação heteróloga e de um microrganismo ou célula transformados com eles.

#### Descrição detalhada da invenção

A LEP-10 e o LTI são novos inibidores proteicos de protease muito semelhantes. São aproximadamente do mesmo tamanho e partilham homologia de sequência com os inibidores de protease da família SSI.

A LEP-10 foi originalmente identificada, por coloração com Azul Brilhante de Coomassie de geles de proteína SDS-PAGE, como sendo uma proteína exportada de baixo peso molecular (cerca de 10 000 daltons) presente no meio de uma cultura da estirpe 1326 de Streptomyces lividans. Os dados obtidos sobre a sequência de aminoácidos em peptídeos derivados de uma digestão trípica do LEP-10 sugerem homologia com o PSN e o SSI. Usando a sequência de aminoácidos de um dos peptídeos

-5-

trípticos da LEP-10 prepararam-se sondas de oligonucleotídeo que foram usadas para identificar os fragmentos de ADN presentes na biblioteca cromossômica do S. lividans 1326 que continha uma sequência putativa da LEP-10. Os plasmídeos que continham estas sequências putativas foram usados para transformar o S. albus, que não produz naturalmente a LEP-10 e verificou-se que os transformantes exprimem o LEP-10.

O LTI foi também originalmente identificado em geles de proteína a partir de uma cultura de S. longisporus. Preliminarmente, a determinação da sua sequência de aminoácidos indicou homologia com a LEP-10. O rastreio inicial de uma biblioteca de um S. longisporus com sondas de oligonucleotídeo da LEP-10, resultou na obtenção de fragmentos de ADN cromossômico que foram hibridados com as sondas da LEP-10 mas que não codificaram o LTI. Cultivou-se um anticorpo policlonal contra o LTI. O anticorpo anti-LTI reagiu com a proteína produzida pelo S. longisporus mas não com a LEP-10. Por sondagem com fragmentos de polinucleotídeo contendo a sequência de codificação da LEP-10, identificou-se então um fragmento de Bam HI de 2,1 kilopares de base, de ADN cromossômico do S. longisporus contendo putativamente o gene LTI. Transformou-se o S. lividans 1326, que não produz o LTI, com um plasmídeo compreendendo a sequência de 2,1 kb que por reacção com o anticorpo anti-LTI mostrou produzir o LTI. Este procedimento que constitui parte do presente invento, compreende a transformação dum hospedeiro de Streptomyces com fragmentos de ADN de outro microrganismo ou célula que se sabe ser capaz de produzir uma proteína exportada. Os clones transformantes são então incubados numa placa de ágar em contacto com um substrato adsorvente, p.e., um filtro de nitrocelulose com um diâmetro de poro de 0,2  $\mu$ m, para permitir que as proteínas exportadas se adsorvam no substrato. O substrato é então retirado e seco, e testado para determinar a reactividade com anti-soros específicos para a proteína exportada, por técnicas convencionais de imuno-ensaio. São seleccionados os clones dos transformantes que reagiram com os anti-soros. O fragmento de ADN, in-

-6-

introduzido nos transformantes pode então ser sub-clonado.

Assim, o presente invento inclui um processo de clonagem e identificação de sequências de ADN que codificam um produto genético exportado, que compreende:

- 1) o isolamento do produto genético de uma cultura de um microrganismo ou célula produtores, formando-se além disso anti-soros específicos;
- 2) a clonagem de fragmentos de ADN de um microrganismo ou célula produtores numa estirpe de Streptomyces não produtora;
- 3) o contacto dos transformantes Streptomyces do passo 2 com um substrato adsorvente e a incubação dos transformantes por um período de tempo suficiente para permitir que as proteínas exportadas pelos transformantes se adsorvem no substrato, e em seguida
- 4) o teste do substrato por forma a determinar a sua reactividade com os anti-soros do passo 1.

Similarmente, as sequências de codificação de LEP-10 e de LTI, ou sequências para proteases similares, podem ser identificadas e isoladas a partir de fontes microbianas ou celulares, por sondagem de hibridação, de fragmentos de ADN cromossómico com fragmentos simples isolados da sequência de codificação da LEP-10 ou do LTI. Estes fragmentos sonda têm preferivelmente um comprimento de pelo menos cerca de 30 nucleotídeos. Assim, o presente invento inclui também um processo de identificação de sequências de codificação de ADN para inibidores de protease que compreende a hibridação de fragmentos das sequências de codificação de LEP-10 ou de LTI com fragmentos de ADN cromossómico de um microrganismo ou célula.

Os inibidores de protease de LEP-10 e de LTI partilham homologia um com o outro e com o SSI e o PSN. A LEP-10 e o LTI são aproximadamente 80% homólogos um com o outro e aproximadamente 70% homólogos com o SSI e o PSN. Apresentam-se se-



-7-

guidamente as sequências de aminoácidos da LEP-10 madura e do LTI maturo, tal como foram determinadas por sequenciação de aminoácidos de digestão trípica e/ou por análises da sequência de ADN. As análises de aminoácidos foram realizadas num sequenciador de aminoácidos Beckman 890M (Beckman Instruments, Fullerton, Califórnia). Mostram-se também as sequências do SSI e PSN publicadas em relatórios onde elas diferem da LEP-10 e do LTI.



-8-

[illegible]

LEP-10 GLY-HIS-GLY-GLU-SER-ALA-ALA-THR-ALA-ALA-PRO-LEU-ARG-ALA-VAL-  
 LTI GLY-HIS-GLY-THR-SER-ALA-ALA-ALA-ALA-ALA-PRO-LEU-ARG-ALA-VAL-  
 PSN -ASN- -THR-VAL-ASN- -GLU-  
 SSI -LYS- -VAL- -THR-THR- -GLU-

3040

LEP-10    THR-LEU-THR-CYS-ALA-PRO-THR-ALA-SER-GLY-THR-HIS-PRO-ALA-ALA-

LTI        THR-LEU-ASN-CYS-ALA-PRO-THR-ALA-SER-GLY-THR-HIS-PRO-ALA-ALA-

PSN             -ASN-

SSI                                  -GLY-PRO-

50

LEP-10	ALA-ALA-ALA-CYS-ALA-GLU-LEU-ARG-GLY-ALA-HIS-GLY-ASP-PRO-SER-
LTJ	ALA-LEU-ALA-CYS-ALA-ASP-LEU-ARG-GLY-VAL-GLY-GLY-ASP-ILE-ASP-
PSN	LEU-GLN-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-GLY-
SSI	GLY-SER-ASP-ALA-ALA-VAL-GLY-LEU-ASN-

LEP-10 ALA-LEU-ALA-ALA-GLU-ASP-SER-VAL-MET-CYS-THR-ARG-GLU-TYR-ALA-  
 LTI ALA-LEU-LYS-ALA-ARG-ASP-GLY-VAL-ILE-CYS-ASN-LYS-LEU-TYR-ASP-  
 PSN -THR-VAL-ARG-GLY-ASP- -ALA- -LYS-GLN-PHE-ASP-  
 SSI -THR-ARG-GLY-GLU-ASP- -PRO-MET-VAL- -ASP-

LEP-10 PRO-VAL-VAL-VAL-THR-VAL-ASP-GLY-VAL-TRP-GLN-GLY-ARG-ARG-LEU-80  
 LTI PRO-VAL-VAL-VAL-THR-VAL-ASP-GLY-VAL-TRP-GLN-GLY-LYS-ARG-VAL-  
 PSN -LYS-ARG-VAL-  
 SSI -LYS-ARG-VAL-

90100

LEP-10	SER-TYR-GLU-ARG-THR-PHE-ALA-ASN-GLU-CYS-VAL-LYS-ASN-ALA-GLY-	
LTI	SER-TYR-GLU-ARG-THR-PHE-GLY-ASN-GLU-CYS-VAL-LYS-ASN-SER-TYR-	
PSN	-THR-	-SER-TYR-
SSI	-VAL- -SER-	-GLU-MET- -HIS-

LEP-10	SER-ALA-SER-VAL-PHE-THR-PHE-COOH
LTI	GLY-THR-SER-LEU-PHE-ALA-PHE-COOH
PSN	GLY-MET-THR-                  -PHE-COOH
SSI	GLY-SER-                      -ALA-PHE-COOH



-9-

A sequência anterior é substancialmente exacta e não é, em nenhum caso, limitativa do presente invento. Está pressuposto que podem obter-se outras sequências de LEP-10 ou de LTI devido, por exemplo, a variações que não afectam significativamente a actividade, a processos alternativos ou a erros analíticos.

A LEP-10 e o LTI têm mostrado inibir a tripsina num teste convencional de inibição de tripsina. Ver, Travis, Meth. Enzym., 80:755-765 (1981). Assim, quer a LEP-10, quer o LTI, podem ser usados em aplicações médicas ou noutras aplicações nas quais se deseje a inibição da tripsina ou a inibição de outra protease. Em comparação com a aprotinina, o LTI é um fraco inibidor da tripsina. Este resultado não é surpreendente dado que os inibidores de protease tendem a ter diferentes especificidades por proteases, mesmo entre os inibidores da família SSI.

A actividade inibidora da tripsina foi determinada num teste cromogénico usando o KABI S2288 como substrato (HO-ILE-PRO-ARG-p-nitroanileto). O corte da ligação ARG-p-nitroanileto liberta a p-nitroanilina que absorve a 410 nm; assim, é medido o grau de clivagem pelo aumento da absorvância a 410 nm. Este teste foi usado numa forma qualitativa para determinar a actividade inibidora de LTI e de LEP-10. Resumidamente, diluições em série de um para dois, quer de meio condicionado (MC) quer de concentrados de sulfato de amónio (SA) de meio condicionado, foram misturadas com 25 ng de tripsina às quais se adicionou o substrato. Após 30 minutos à temperatura ambiente, parou-se o teste por adição de ácido acético. O teste foi efectuado em placas de microtitulação que foram então lidas num leitor de ELISA. Incluíram-se como controlos amostras similares de PSN. As amostras de LTI tinham um forte pigmento preto-acastanhado, que deu um grande contraste no ensaio; a proteína purificada contudo mostra também actividade inibidora. Os valores apresentados são os valores de absorvância medidos após a clivagem do substrato cromogénico pela tripsina. O meio de crescimento não mostra ele próprio qualquer actividade (não se apresentam os valores).

-10-

Diluição Recíproca	MC		Inibidor SA		SA LEP-10
	LTI	PSN	LTI	PSN	
No. In.	0,898	0,772	0,763	0,751	n.d.
1	0,170	0,010	0,081	0,018	0,070
2	0,195	0,046	0,087	0,021	0,091
4	0,187	0,046	0,078	0,023	0,130
8	0,182	0,053	0,081	0,024	0,165
16	0,187	0,058	0,092	0,036	0,219
32	0,209	0,273	0,176	0,076	0,293

A LEP-10 e o LTI mostraram ambos uma elevada actividade quando comparada com a do PSN. Porém, em virtude das diluições usadas serem todas baixas demais para atingir um grau de inibição de 50%, as actividades não podem ser comparadas com exactidão. ("n.d." significa não detectada).

As proteínas podem também ser usadas para inibir proteases endógenas de Streptomyces ou outras proteases e desse modo inibir a degradação de produtos proteicos desejados, incluindo as proteínas heterólogas produzidas por técnicas de ADN recombinante. Para este propósito podem adicionar-se um ou ambos os inibidores a uma cultura de Streptomyces ou de outros microrganismos ou células, p.e., E. coli, Bacillus, levedura, células de insectos ou mamíferos. Alternativamente, as estirpes de Streptomyces ou outros hospedeiros podem ser transformados por engenharia genética para produzir um ou ambos os inibidores conjuntamente com uma proteína de interesse, tal como a seguir se descreve.

As proteínas podem também ser usadas para inibir a degradação de proteínas em soluções contendo proteases, e como reagentes laboratoriais, por exemplo num teste de inibição de protease. Por exemplo, o LTI tem demonstrado inibir a conversão do tPA de cadeia simples no tPA de cadeia dupla.

A unidade de expressão genética da LEP-10, isto é, a sequência de ADN contendo a sequência de codificação da LEP-10 e as regiões reguladoras necessárias para a transcrição e tra

-11-

dução foi localizada num fragmento PstI de 4 kb de ADN cromossómico do S. lividans 1326, e além disso num seu fragmento BamHI-PstI de 2,97 kb. Verificou-se que a unidade de expressão genética de LTI está presente num fragmento BamHI de 2,1 kb de ADN cromossómico do S. longisporus.

As unidades de expressão genética de LEP-10 e de LTI podem ainda ser isoladas por endonuclease de restrição adicional ou por digestões de endonucleases/exonucleases e por clonagem e expressão dos seus fragmentos ou por sequenciação de ADN adicional. A sequência de codificação sózinha pode ser isolada e clonada por técnicas similares, na forma de um vector de expressão e a região reguladora sózinha pode ser isolada e clonada, na forma de um vector sonda promotor. Mais especificamente, pode fundir-se a sequência de codificação, em cadeia com um promotor, num plasmídeo. Este plasmídeo é usado para transformar um hospedeiro de Streptomyces ou outro, p.e., de E. Coli, de B. subtilis, de levedura, de insecto ou de mamífero. Este hospedeiro recombinante é então cultivado e os extractos de meio ou celulares são rastreados para determinar a presença do inibidor. O rastreio pode ser realizado, por exemplo, por electroforese de proteínas em gel, onde o inibidor pode ser detectado como uma proteína de 10 kd, por um teste de inibição da tripsina, por imunodeteção usando um anticorpo anti-LTI ou anti-LEP-10, por hibridação com sondas ou fragmentos LTI ou LEP-10, e/ou por análise da composição de aminoácidos ou sequenciação de proteínas putativas de LTI ou de LEP-10. Exemplos de promotores que se sabe funcionarem em Streptomyces são o promotor da beta-galactosidase do Streptomyces, o promotor de lâmbda (PL), à esquerda, o promotor da tirosinase e os promotores de genes que conferem resistência aos antibióticos, p.e., resistência à eritromicina, resistência à neomicina e resistência a tioestreptona.

As regiões reguladoras da LEP-10 ou de LTI podem ser inseridas num vector sonda promotor, isto é, num vector com uma sequência de codificação para um marcador fenotípico facilmente detectável, de tal modo que, após a inserção de um pro-



-12-

motor funcional a montante da sequência do marcador, a sequência seja expressa. Exemplos de marcadores úteis em Streptomyces são: marcadores de resistência a antibióticos, p.e., a tioestreptona, a canamicina e a  $\beta$ -galactosidase de Streptomyces.

As regiões reguladoras de LEP-10 e de LTI podem ser usadas para exprimir a LEP-10 ou o LTI na unidade de expressão genética nativa, ou para exprimir polipeptídeos ou proteínas heterólogas numa unidade de expressão genética híbrida na forma de fusões de transcrição ou de tradução. O promotor quer da LEP-10 quer do LTI pode, por exemplo, ser fundido em cadeia a montante de uma sequência de codificação para antígenos de vacina, p.e., antígeno de superfície da Hepatite B, e glicoproteína rábica; ou para proteínas farmacologicamente activas, p.e. interleuquinas, activadores de plasminogénio, outros inibidores de protease tais como a alfa-1-antiprotease, o factor de necrose de tumores, o Factor VIII e o da gripe NS1. O sinal de exportação de LEP-10 ou de LTI pode igualmente ser isolado e ligado a uma sequência de codificação de um polipeptídeo que não é normalmente excretado, em cadeia e a jusante de um promotor.

Os derivados funcionais de cada domínio das unidades de expressão genética do invento, i.e., funções de promotor, funções de exportação e funções de inibição de protease, podem ser preparados pela utilização de endonucleases de restrição, por mutagénese aleatória, p.e., por irradiação com ultravioletas e por mutagénese dirigida a centros, p.e., por inserção, adição ou substituições de oligonucleotídeos sintéticos. Estes derivados podem ser facilmente testados em relação ao seu efeito na função. Ver, p.e., Davis et al., "Adv. Bact. Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory (1980); Miller, "Experiments in Molecular Genetics", Unit III, Cold Spring Harbor Laboratory (1972); Botstein et al., Science 229:1193 (1985); e Estell et al., Science 233:659 (1986). No âmbito do presente invento estão também incluídos derivados funcionais das sequências de codificação e o processo de preparação das proteínas variantes.

-13-

Os derivados funcionais das proteínas podem também ser preparados por alteração directa das proteínas. Esta alteração pode ser realizada por meios químicos incluindo a clivagem para remover aminoácidos e a inserção ou adição de aminoácidos. Estes derivados quimicamente preparados podem ser testados relativamente à sua actividade, por exemplo, por um teste de inibição de tripsina. No âmbito do presente invento inclui-se também o processo químico de preparação destes derivados funcionais.

O LTI parece ser expresso na forma de um LTI pré-pró, com uma sequência de sinal que aparentemente é clivada na secreção e com uma sequência pró que é clivada extracelularmente. No S. longisporus são segregadas espécies com dois pesos moleculares. O pró LTI putativo tem 6 aminoácidos adicionais no terminal N quando comparado com o LTI maturo. No S. lividans observam-se também espécies com dois pesos moleculares, mas a análise da sequência de aminoácidos N-terminal indica que os centros de processamento no S. lividans podem ser diferentes dos do S. longisporus.

Indica-se seguidamente a sequência de ADN para a sequência de codificação do LTI e para algumas regiões a montante e a jusante não traduzidas. Na sequência indicam-se por barras (/) os centros de sinal putativo e de clivagem extracelular no S. longisporus. Os centros de sinal putativo e de clivagem extracelular no S. lividans estão respectivamente 3 aminoácidos e 1 aminoácido a jusante (3').

-14-

```

-140      -130      -120      -110      -100      SstII      -80
*          *          *          *          *          ↓          *
TTCAACAGCG AAGGTTACTG AAACACATGG GGTOGAGGTG TTTTTOOGOG GGGTACATG CGTGOGACTC

-70      -60      -50      -40      -30      -20      -10
*          *          *          *          *          *          *
GCGCTOGCOG GTCGGGCACC AAACOGGAAC GGGTOGGCAC AOCCTOGAAT OCTGOGGAAG GATGCACACA

          10          20          30          40          50
          *          *          *          *          *
ATG CCG AAC ACC GCG GCG TGG GCA GCG ACC CTC GCG CTC ACG GCG ACC GCG GTC TGC
met arg asn thr ala arg trp ala ala thr leu ala leu thr ala thr ala val cys

        60          70          80          100          110
        *          *          *          *          *
GGA CCG CTC ACC GGA GCG GCG CTC GCG ACC CCG GCG GCT GCT CCG GCG TOG CTC TAC
gly pro leu thr gly ala ala leu ala/Thr Pro Ala Ala Ala/Pro Ala Ser Leu Tyr

        120          130          140          150          NotI          170
        *          *          *          *          ↓          *
GCG CCG TOG GCG CTG GTG CTC ACC GTC GCG CAC GCG ACA AGC GCG GCG GCG GCG GCG
Ala Pro Ser Ala Leu Val Leu Thr Val Gly His Gly Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala

        180          190          200          210          220
        *          *          *          *          *
COG CTG CCG GCG GTC ACC CTG AAC TGC GCG CCG ACG GCG TOC GGA ACC CAT CCG GCG
Pro Leu Arg Ala Val Thr Leu Asn Cys Ala Pro Thr Ala Ser Gly Thr His Pro Ala

230          240          250          260          270          280
*          *          *          *          *          *
gcn gcn CTC GCG TGC GCG GAC CTG CCG GCG GTC GCG GGT GAC ATC GAC GCG CTG AAG
Ala Ala Leu Ala Cys Ala Asp Leu Arg Gly Val Gly Gly Asp Ile Asp Ala Leu Lys

        290          300          310          320          330          340
        *          *          *          *          *          *
GCG CGA GAC GCG GTG ATC TGC AAC AAG CTG TAC GAC CCG GTC GTC GTC ACG GTC GAC
Ala Arg Asp Gly Val Ile Cys Asn Lys Leu Tyr Asp Pro Val Val Val Thr Val Asp

        350          360          370          380          390
        *          *          *          *          *
GGA GTC TGG CAG GCG AAG GCG GTC TOC TAC GAA CCG ACC TTC GCG AAC GAG TGC GTG
Gly Val Trp Gln Gly Lys Arg Val Ser Tyr Glu Arg Thr Phe Gly Asn Glu Cys Val

400          410          420          430          440          450
*          *          *          *          *          *
AAG AAC TOC TAC GCG ACC AGC CTC TTC GCG TTC TGA GAGA CCGGATOGCG GAGTCTCTGT
Lys Asn Ser Tyr Gly Thr Ser Leu Phe Ala Phe —

460          470          480          490          500          510          520
*          *          *          *          *          *          *
GCACAOCTGA AGAGGCAOCC AGTTGGGGAG TGCGAGTCCC TTGTGOGGG TACCOGTGGA TTGACGChA

```

-15-

Deve entender-se que a sequência anterior é substancialmente correcta, e que não é em nenhum caso limitativa do presente invento. A sequência ilustrada pode, por exemplo estar incorrecta num ou nalguns pares de bases e/ou aminoácidos. Podem também existir ou ser preparadas outras sequências que também codificam o LTI, sequências essas que podem diferir num ou em alguns pares de bases e/ou aminoácidos. Estas outras sequências deverão ser pelo menos cerca de 90% homólogas com a sequência de ADN apresentada. Também a clivagem das sequências pré e pró pode ocorrer na realidade em centros diferentes ou adicionais.

Podem manipular-se as quantidades relativas de pró LTI e de LTI maturo. S. longisporus cultivado em caldo de tripti case de soja tamponado com tampão MOPS 100 mM (ácido 4-morfolinopropanossulfónico) (pH 7,0) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) durante 48 a 78 horas, origina predominantemente o pró LTI.

Indica-se seguidamente a sequência de ADN da sequência de codificação de LEP-10 e para as mesmas sequências a montante e a jusante. Indica-se também o sinal do centro de clivagem. Como no caso da sequência para o LTI, anteriormente ilustrada, a sequência seguinte é substancialmente correcta e não é limitativa do presente invento.



	10			20				30				40				50			60
AAC	*	ACC	GCG	CGC	TGG	GCA	GCG	ACT	CTG	GGC	CTG	ACG	GCC	ACC	GCC	GTC	TGC	GGG	CCC
Asn		Thr.	Ala	Arg	Trp	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Val	Cys	Gly	Pro
			70			80			90				100	Clivagem	110				120
			*			*			*				*	do sinal	*				*
CTC	GCC	GGG	GCC	TCC	CTC	GCC	TCC	CCG	GCC	ACC	GCC	CCC	CGC	TCG	CTC	TAC	GCC	CCC	
Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Pro	
			130			140			150				160			170			
			*			*			*				*			*			
TCG	GCC	CTG	GTG	CTG	ACC	GTG	GGG	CAC	GGA	GAG	AGC	GCT	GCC	ACC	GCC	GCA	CCC	CTG	
Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Thr	Val	Gly	His	Gly	Glu	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	
	180			190				200				210				220			230
	*			*				*				*				*			*
CGC	GCG	GTC	ACC	CTG	ACC	TGC	GCC	CCG	ACC	GCC	TCC	GGC	ACC	CAC	CCG	GCG	GCC	GCC	
Arg	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Ala	Pro	Thr	Ala	Ser	Gly	Thr	His	Pro	Ala	Ala	Ala	



-17-

240                      250                      260                      270                      280                      290  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 GCG GCC TGT GCC GAA CTG CGC GCC GCG CAC GGC GAC CCG AGT GCC CTG GCC GCC GAG  
 Ala Ala Cys Ala Glu Leu Arg Ala Ala His Gly Asp Pro Ser Ala Leu Ala Ala Glu  
  
 300                      310                      320                      330                      340  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 GAC TCG GTG ATG TGC ACC CGG GAG TAC GCC CCC GTG GTC GTC ACC GTC GAC GGC GTC  
 Asp Ser Val Met Cys Thr Arg Glu Tyr Ala Pro Val Val Val Thr Val Asp Gly Val  
  
 350                      360                      370                      380                      390                      400  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 TGG CAG GGG CGG CGC CTC TCC TAC GAA CGC ACC TTC GCC AAC GAG TGC GTG AAG AAC  
 Trp Gln Gly Arg Arg Leu Ser Tyr Glu Arg Thr Phe Ala Asn Glu Cys Val Lys Asn  
  
 410                      420                      430                      440                      450                      460  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 GCG GGC AGC GCG AGC GTC TTC ACG TTC TGA GGG ACC GGG ACC GCC GGA CTG CGC GTG  
 Ala Gly Ser Ala Ser Val Phe Thr Phe ---  
  
 470                      480                      490                      500                      510  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 ATC GGC TGC TCG CTA CTG GGG AGT GCG AGC GCC GCC GTA CGG GTC CCG CGG GCC CGC  
  
 520                      530                      540                      550                      560                      570  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 ACC GGG GAC GGC GGA CGG AGT GGG GCC GTC CGC CGT TCT CCC GGT TCA GGG GCA CGG  
  
 580                      590                      600                      610                      620                      630  
 \*                      \*                      \*                      \*                      \*                      \*  
 TCG GCC GTT CGC GGC CGG GCC GTC CGC GGC CCT GGC GGA CCG GGC ACG GTG GCT GTG  
  
 640                      650  
 \*                      \*  
 TCG CAC CAC GGA TAG CGC CGA CTG

-18-

As proteínas LEP-10 e LTI, como foi anteriormente referido, foram originalmente descobertas como produtos do S. lividans 1326 e do S. longisporus. Porém é provável que outras estirpes e espécies produzam as mesmas ou substancialmente as mesmas proteínas, i.e., proteínas substancialmente homólogas ( $>90\%$ , especialmente  $>95\%$ ) e com substancialmente a mesma especificidade e actividade por um substrato (protease). As proteínas LEP-10 e LTI podem também ser sintetizadas por técnicas convencionais de síntese de proteínas, ou as suas sequências de codificação de ADN podem ser sintetizadas por técnicas convencionais de síntese de ADN. Assim, o presente invento inclui todas as proteínas LEP-10 e LTI e as suas unidades de expressão genética e domínios funcionais.

Podem sintetizar-se sondas de oligonucleotídeo para a detecção de sequências de ADN similares em outras estirpes e espécies, com base nas sequências de LEP-10 e de LTI. Porém, tal como foi anteriormente referido, os resultados da sondagem com estes oligonucleotídeos podem produzir falsos positivos. Deste modo prefere-se a sondagem, inicial ou secundária, com fragmentos de ADN maiores, p.e., maiores do que cerca de 30 nucleotídeos, e preferivelmente, maiores do que cerca de 50 nucleotídeos. Por estas técnicas de sondagem podem identificar-se genes que codificam os mesmos inibidores ou outros inibidores da família SSI.

Por técnicas de ADN recombinante podem usar-se as sequências de codificação preparadas de acordo com o presente invento, para produzir grandes quantidades de LEP-10 e de LTI. Estas técnicas compreendem, essencialmente a transformação de um hospedeiro, bacteriano ou eucariótico, com uma unidade de expressão genética compreendendo a sequência de codificação de LEP-10 ou de LTI preparada de acordo com a invenção. Para este propósito pode usar-se a unidade de expressão genética nativa num plasmídeo ou num outro vector, ou uma unidade de expressão genética híbrida compreendendo a sequência de codificação do inibidor e uma região reguladora heteróloga. Os inibidores assim preparados são purificados até ao grau de pu



-19-

reza desejado por técnicas convencionais de isolamento de proteínas.

Os Exemplos seguintes são ilustrativos e não limitativos do presente invento.

#### EXEMPLOS

##### Exemplo 1. LEP-10

Cultivou-se S. lividans, estirpe 1326 ("Agricultural Research Culture Collection, Peoria, Illinois, NRRL 15091) em caldos de SL-glicerol, SL-glucose e YEMES a 28°C durante aproximadamente 30 horas. Após depositar as células por centrifugação a baixa velocidade, concentraram-se os sobrenadantes por precipitação com sulfato de amónio, redissolveram-se e sujeitaram-se a electroforese em geles SDS-PAGE (15%) para separar os produtos proteicos. Após coloração com Azul Brilhante de Coomassie R-250, identificou-se uma banda densa correspondente a uma proteína com um peso molecular de cerca de 10 000 daltons como tendo sido expressa em certos caldos. O meio SL compreende os componentes SL-A e SL-B e uma solução de elementos vestigiais com a seguinte composição:

##### SL-A

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g/l
asparagina-L	2,0 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	9,0 g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l

##### SL-B

extracto de levedura	20 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5,0 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l
solução de elementos vestigiais	20 ml/l

-20-

Solução de elementos vestigiais

$\text{ZnCl}_2$	40 mg/l
$\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l

O SL-A é esterilizado em autoclave e o SL-B é esterilizado por filtração antes de serem misturados numa proporção de SL-B:SL-A de 1:10 (v/v). Para preparar SL-glucose e o SL-glicerol adicionam-se respectivamente 1% (p/v) de glucose e de glicerol.

Dos geles, cortaram-se e removeram-se amostras da proteína. A proteína foi reduzida e S-dansilamidoetilada com dansilazridina. Digeriu-se a proteína alquilada com tripsina e recuperaram-se os peptídeos tripticos por HPLC de fase inversa. Os peptídeos individuais foram postos em sequência num sequenciador Beckman, por forma a obter-se a estrutura primária com as características anteriormente referidas.

Com base na sequência de aminoácidos prepararam-se séries de sondas de oligonucleotídeo de cadeia simples. A sonda #263 era uma 24-mer mista com a sequência seguinte:

G  
3'CGGAAGCGCTTGCTCAGCAGTTC5'  
C     T     T     C

Estas sondas foram usadas para sondar uma biblioteca fago Charon de ADN cromossómico de S. lividans 1326 preparada substancialmente como é descrito por Maniatis et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", 1982, Cold Spring Harbor Laboratory.

O fago recombinante, Charon 25,5 (Ch25,5), contém ADN cromossómico do Streptomyces lividans 1326 que se hibrida com a sonda mista de oligonucleotídeo #263. Esta sonda é complementar com as ARN-m de LEP-10. Clonou-se um fragmento BglII-

-21-

-EcoRI (cerca de 18 kb) do Ch 25,5 no centro BamHI-EcoRI do plasmídeo pUC18 por forma a obter-se o plasmídeo pD1.

A partir do pD1 isolou-se um fragmento PstI (cerca de 4 kb) que também se hibridou com a sonda de oligonucleotídeo. Este fragmento PstI foi clonado no centro PstI do pBR322 por forma a obter-se o plasmídeo pBR33. O fragmento PstI de 4 kb contém um fragmento BamHI-PstI (cerca de 2,97 kb) fragmento este que se hibrida com a sonda de oligonucleotídeo.

Clonaram-se ambos os fragmentos PstI de 4 kb e BamHI-PstI de 2,97 kb no vector plasmídeo de vaivém pMB157 que é um vector de vaivém de baixo número de cópia do E. coli-Streptomyces compreendendo as funções SCP2 de estabilização e replicação, as sequências pUC8 e de resistência à tioestreptona e a ampicilina. Os plasmídeos recombinantes pMB157-21 e pMB157-8 (que contém o fragmento BamHI-PstI de 2,97 kb) e o plasmídeo pMB157-22 (que contém o fragmento PstI de 4 kb) foram transformados em protoplastos do S. albus que se verificou anteriormente não produzir LEP-10. As colónias dos transformantes foram analisadas por imunomancha para determinar a produção de proteína LEP-10. Aplicaram-se filtros de nitrocelulose (0,2  $\mu$ m) directamente a placas contendo colónias dos transformantes. Após se removerem os filtros das placas processaram-se os filtros com anticorpo da LEP-10 pelo procedimento de Western Blot. Os transformantes de S. albus contendo os plasmídeos recombinantes produziram LEP-10 extracelular, tal como foi determinado por este procedimento de imunoblot. Detectou-se também LEP-10 em sobrenadantes de culturas de S. albus (pMB157-22) e de S. albus (pMB157-21) cultivados em meio SL-glicerol, por Western Blot de geles SDS-PAGE. Assim, no fragmento BamHI-PstI de 2,97 kb está presente toda a informação necessária para produzir no S. albus uma proteína LEP-10 extracelular madura.

Identificou-se uma sequência parcial do gene LEP-10 num fragmento RsaI (de cerca de 180 pb) isolado a partir do fago recombinante Ch 25,5. Este fragmento RsaI está presente em ambos os fragmentos PstI de 4 kb e BamHI-PstI de 2,97 kb



-22-

anteriormente referidos. Este fragmento RsaI contém uma sequência de codificação do terço carboxi-terminal da proteína LEP-10.

#### Exemplo 2. LTI

Usando as sondas oligo LEP-10 descritas no Exemplo 1 anterior, identificaram-se regiões de homologia no ADN cromossômico do S. longisporus (ATCC 23931) que se verificou anteriormente produzir uma pequena proteína exportada de cerca de 10 kd, possuindo homologia de sequência de aminoácidos N-terminal com o LEP-10. Os resultados obtidos sobre a sequência de ADN mostraram subsequentemente que estes fragmentos de ADN não codificavam uma proteína do tipo LEP-10.

Foi utilizada uma aproximação alternativa envolvendo a clonagem do gene LTI num Streptomyces e a identificação dos clones por rastreio com um anticorpo anti-LTI. O anticorpo contra o LTI purificado, foi criado em coelhos e verificou-se que reagia com o LTI mas não com a LEP-10. Verificou-se também que este anticorpo reage com a proteína produzida por colônias de S. longisporus adsorvidas em filtros de nitrocelulose de 0,2  $\mu$ m após 4 horas de incubação a 28°C mas não com a proteína produzida pelo S. lividans. A detecção foi realçada por detecção do complexo LTI-anticorpo usando IgG de cabra, anti-coelho biotinilada e complexo de estreptavidina-biotina-peroxidase de rábano biotinilado. (um conjunto Vectastain, de Vectastain Laboratories, Burlingame, Califórnia). Para a clonagem identificou-se um fragmento BamHI de 2,1 kb no ADN do S. longisporus usando três sondas com fragmentos LEP-10 diferentes incluindo o fragmento RsaI. Clonaram-se fragmentos BamHI de 2-2,3 kb no plasmídeo pIJ703 (Katz et al., J. Gen. Microbiol. 129:2703-2714 (1983)) (corte - BglII) e transformaram-se no S. lividans. Os transformantes foram rastreados com anticorpo anti-LTI para identificar um clone positivo. (Pela utilização de um vector de baixo número de cópia obteve-se num ensaio idêntico uma frequência mais alta).

Este clone positivo estava num grupo de seis colônias

-23-

e teve de ser recolhido e de novo rastreado. A partir das colônias positivas isolou-se um ADN de plasmídeo que se verificou conter uma inserção de cerca de 2,1 kb. Os sobrenadantes das culturas (caldo de tripticase de soja, 28°C, 48 horas) destes positivos foram manchados em filtros de nitrocelulose tal como anteriormente se descreve e sondados com anticorpo anti-LTI tendo-se verificado serem positivos. A transformação de S. lividans e de S. albus, que como se verificou anteriormente não produzem LTI, com ADN plasmídeo, teve como resultado a produção de LTI verificada por análise Western e por inibição da tripsina dos sobrenadantes de S. albus. As manchas Southern foram sondadas com um fragmento de ADN contendo o fragmento RsaI de LEP-10 e observou-se a hibridação na inserção.

O LTI é colhido, a partir do meio condicionado do Streptomyces longisporus, por precipitação com sulfato de amónio (65% de saturação). O precipitado, que flutua, é recolhido por centrifugação que faz com que o precipitado forme um tapete denso flutuando na superfície do líquido. Este tapete é recolhido e de novo suspenso em acetato de amónio 10 mM, pH 6,0, e dialisado contra 50 a 100 volumes do mesmo tampão durante 16 a 18 horas. Recolhe-se a amostra dialisada e remove-se por centrifugação a elevada quantidade de material castanho escuro fibroso que permanece insolúvel. Aplica-se o sobrenadante clarificado a uma coluna de carboximetilcelulose (CM-52, Whatman) equilibrada num tampão de diálise. Após a proteína não ligada ser removida por lavagem, a coluna é desenvolvida com um gradiente linear de acetato de amónio de 10 a 250 mM, pH 6,0. O LTI é eluído a aproximadamente 150 mM de acetato de amónio. O pico de LTI reunido é dialisado contra acetato de amónio 10 mM, pH 6, e armazenado a 4°C.

### Exemplo 3. Expressão e secreção de genes heterólogos usando as regiões reguladoras de LTI

O pLTI520 é pUC18 (Yanisch-Perring et al., Gene 33:103 (1985)) contendo toda a sequência de codificação de LTI e cerca de 410 pares de bases a montante, num fragmento SacI-KpnI



-24-

de 920 pares de bases de ADN cromossômico do S. longisporus. Ligou-se um fragmento BanI cheio da interleuquina-1 beta (IL-1B) (Myers et al., J. Biol. Chem. (no prelo)) que não tem uma região reguladora, com a sequência LTI no centro NotI (entre as bases 158 e 159 na sequência de ADN para o LTI anteriormente ilustrada); o centro NotI foi cortado por tratamento com nuclease de feijão tipo soja ("mung bean") antes da ligação.

Inseriu-se no pSK02 (Brawner et al., Gene 40:191 (1986)) um fragmento XmnI-BamHI do pLTI520, contendo a fusão LTI-IL-1B. O centro Xmn está no gene de resistência à ampicilina, em pUC 18. O centro BamHI está na região de poli-ligação a montante do lac Z em pUC 18.

O derivado pSK02 foi transformado numa estirpe mutante de S. lividans 1326 deficiente em galK, estirpe 12K (Brawner et al., anteriormente citado). Após esporulação inocularam-se os transformantes num caldo de tripticase de soja (TSB) e incubaram-se a 28°C durante pelo menos 72 horas.

Os sobrenadantes e extractos celulares foram analisados por SDS-PAGE e por imuno-blotting Western. Estas análises mostraram a expressão e secreção de duas proteínas que reagem ambas com anti-IL-1B policlonal. Uma das duas pareceu ser IL-1B madura. A outra tinha uma mobilidade menor, o que é consistente com o que seria de esperar para a IL-1B fundida com 17 aminoácidos de IL-1B madura.

#### Exemplo 4. Expressão e secreção de genes heterólogos usando as regiões reguladoras de LEP-10

Construiu-se em pUC 18 uma fusão LEP-10-IL-1B. A fusão continha ADN de S. Lividans desde um centro HinfI (entre as bases -132 e -133 na sequência para a LEP-10, ilustrada anteriormente) até um centro cortado BglI (entre as bases 85 e 86). O centro BglI cortado foi ligado a um centro AvaI cheio em pUC 18. Ligou-se então um fragmento de ADN contendo o fragmento BanI IL-1B com um ligante BamHI, a um centro BamHI em pUC 18

-25-

tendo-se obtido a construção que se segue:

1	2	3	4
***CTC GCC T	CC GGG	GAT CCG	GCA CCT***

onde a região 1 é derivada da LEP-10, a região 2 é derivada de pUC 18, a região 3 é do ligante e a região 4 é a sequência de codificação IL-1B. Foram então inseridas as sequências de manutenção do vector de Streptomyces, pIJ102 (Kieser et al., Mol. Gen. Genet. 185:223 (1982)).

Após a transformação do S. lividans 12K e da cultura dos transformantes em caldo de tripticase de soja, observou-se por imunoblotting de Wester uma proteína extracelular que corresponde aproximadamente à IL-1B madura. Ainda que a análise da sequência N-terminal da proteína excretada não tenha sido realizada, parece que a clivagem pode ocorrer entre o primeiro resíduo (alanina) e o segundo resíduo (prolina) de IL-1B para remover a sequência de sinal de LEP-10.

Os exemplos 4 e 5 demonstram a utilidade das regiões reguladoras de LEP-10 e de LTI tanto para exprimir produtos genéticos heterólogos em Streptomyces como para exportar produtos genéticos heterólogos que de outro modo não seriam exportados.

A descrição e os exemplos anteriores descrevem completamente o presente invento e as suas concretizações preferidas. A invenção não está porém limitada às concretizações precisas aqui descritas mas inclui também todas as modificações abrangidas pelo âmbito das reivindicações que se seguem.



-26-

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de clonagem e identificação de sequências de ADN que codificam um produto genético exportado, que compreende:

- 1) o isolamento do produto genético de uma cultura de um microrganismo ou de uma célula produtores, formando-se além disso um anti-soro específico,
- 2) a clonagem de fragmentos de ADN de um microrganismo ou célula produtores numa estirpe de Streptomyces não produtora,
- 3) o contacto dos transformantes Streptomyces do passo 2 com um substrato adsorvente e a incubação dos transformantes por um período de tempo suficiente para permitir que as proteínas exportadas pelos transformantes se adsorvam no substrato, e
- 4) o teste do substrato por forma a determinar a sua reactividade com o anti-soro do passo 1.

2 - Processo de identificação de sequências de codificação de ADN para inibidores de protease que compreende a hibridação de fragmentos das sequências de codificação LEP-10 ou LTI com fragmentos de ADN cromossómico de um microrganismo ou célula.

3 - Processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante compreendendo a unidade de expressão genética LEP-10 ou LTI, processo que compreende a hibridação de ADN cromossómico com uma sonda baseada na unidade de expressão genética LEP-10 ou LTI para identificar regiões de ADN cromossómico que compreendem a unidade de expressão genética LEP-10 ou LTI e o isolamento das regiões de ADN cromossómico identificadas, por restrição com uma endonuclease de restrição.

4 - Processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante compreendendo a região reguladora LEP-10 ou LTI,

-27-

processo que compreende, a hibridação de ADN cromossômico com uma sonda baseada na região reguladora LEP-10 ou LTI para identificar regiões de ADN cromossômico que compreendem a região reguladora LEP-10 ou LTI, e o isolamento das regiões de ADN cromossômico identificadas, por restrição com uma endonuclease de restrição.

5 - Processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante compreendendo a sequência de codificação LEP-10 ou LTI, processo que compreende a hibridação de ADN cromossômico com uma sonda baseada na sequência de codificação LEP-10 ou LTI para identificar regiões de ADN cromossômico que compreendem a sequência de codificação LEP-10 ou LTI, e o isolamento das regiões de ADN cromossômico identificadas, por restrição com uma endonuclease de restrição.

6 - Processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante compreendendo a sequência de sinal de exportação de LEP-10 ou de LTI, processo que compreende, a hibridação de ADN cromossômico com uma sonda baseada na região da sequência de sinal de exportação de LEP-10 ou de LTI para identificar regiões de ADN cromossômico que compreendem a sequência de sinal de exportação de LEP-10 ou de LTI, e o isolamento das regiões de ADN cromossômico identificadas, por restrição com uma endonuclease de restrição.

7 - Processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante compreendendo uma sequência de codificação híbrida contendo uma parte da sequência de codificação LEP-10 ou de LTI fundida com uma sequência de codificação heteróloga, processo que compreende a restrição de uma molécula de ADN recombinante, contendo toda ou uma parte da sequência de codificação de LEP-10 ou de LTI num ponto a jusante da porção da sequência de codificação de LEP-10 ou de LTI, e a ligação da dita parte de uma sequência de codificação para um polipeptídeo heterólogo.

8 - Processo de preparação de um polipeptídeo em Strepto-

-28-

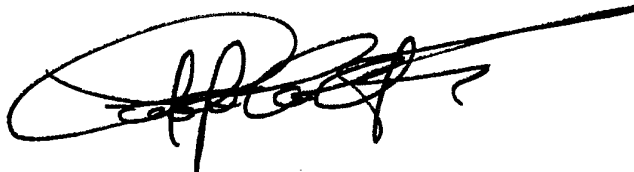
myces que compreende a ligação de um fragmento de ADN que codifica para o polipeptídeo com a unidade de expressão genética LTI ou LEP-10 ou com uma sua parte, para preparar uma molécula de ADN recombinante, a transformação de organismos Streptomyces com a molécula de ADN recombinante, e a cultura do Streptomyces transformada por forma a que seja expresso o polipeptídeo.

Lisboa,

17.10.1987

Por SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION

- O AGENTE OFICIAL -

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to an official representative of SmithKline Beckman Corporation.