

(11) *Número de Publicação:* **PT 88293 B**

(51) *Classificação Internacional: (Ed. 5)*
C12N015/00 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1988.08.18	(73) Titular(es): THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION FRUIT STREET BOSTON MASSACHUSETTS 02114 US
(30) Prioridade: 1987.08.21 US 087936	
(43) Data de publicação do pedido: 1989.09.14	(72) Inventor(es): JOHN A. SMITH US
(45) Data e BPI da concessão: 09/94 1994.09.09	(74) Mandatário(s): JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT
(54) Epígrafe: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HIDROLASE DE PEPTIDEOS ACILADOS	
(57) Resumo:	

[Fig.]

88.293



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O invento descreve o processo para a preparação de uma sequência de aminoácidos da hidrólise de peptídeos acilados. O invento relaciona-se também com um processo para a preparação de uma molécula de DNA codificada por APH de um vector que inclui a molécula e com a utilização de tal vector para transformar im hospedeiro. O invento relaciona-se ainda com a expressão pelo hospedeiro para produzir APH e a utilização de APH, para catalisar a hidrólise

=====

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HIDROLISE DE PEPTÍDEOS ACILADOS"



de um peptídeo ou proteína N α -acetilado ou a reacção entre um dador aminoácido N α -acetilado e uma proteína aceitadora com um grupo α -NH₂ livre.

Fundamento do Invento

Campo do invento

O presente invento é dirigido à produção de Hidrolase de Peptídeos Acilados através da tecnologia de DNA recombinante. Dirige-se também à utilização da enzima para catalisar a hidrólise de um peptídeo ou proteína acilados e a reacção entre um dador derivatizado de aminoácidos de N^{α} -acetilados e uma proteína aceitadora com um grupo α -NH₂ livre.

Breve descrição de trabalhos anteriores

Desde a descoberta de um grupo acetilo no extremo amino da proteína da cápsula do vírus do mosaico do tabaco, têm sido encontrados uma série de proteínas N^{α} -acetilados em animais, plantas e seus vírus e também em bactérias e fungos. A N^{α} -acetilação é assim considerada uma das modificações típicas das proteínas nos organismos vivos. Ainda, nalgumas células eucarióticas, foi sugerido que mais de 80% das proteínas solúveis intracelulares são N^{α} -acetiladas (Brown, J.L., J. Biol. Chem. 254: 1447-1449 (1979)).

O significado biológico de N^{α} -acetilação de proteínas é ainda uma questão em aberto (ver Tsunawasa et al., Method Enzymol. 106: 165-170 (1984)). Tem sido proposto que estas modificações pós-tradução protege da proteólise as proteínas intracelulares. No entanto, isto não parece ser verdade para todas as proteínas. No caso da activa do

do pseudoplasmodio, a degradação proteolítica torna-se mais lenta quando a proteína é N^α-acetilada. Ao contrário, a hemoglobina de gato é degradada à mesma velocidade independentemente da N^α-acetilação (Tsunasawa et al., 1984).

Resultados recentes da sequência de DNA mostraram que nos genes estruturais das proteínas secretadas que são N^α-acetiladas, o codão do resíduo amino-terminal acetilado é directamente precedido pelo codão de iniciação sem a inserção de codões adicionais de aminoácidos (Tsunasawa et al., 1984). Tem-se feito pouco esforço para compreender a relação entre N^α-acetilação e o transporte de proteínas secretadas através de membranas biológicas. Para compreender totalmente a função da N^α-acetilação será importante identificar os aminoácidos N^α-acetilados nas proteínas e peptídeos numa escala microanalítica. Com esta finalidade de remoção do grupo N^α-acetilo ou do aminoácido N^α-acetilado deve ser conseguido de modo eficaz.

A Hidrolase de Peptídeos Acilados (APH) tem sido usada com êxito na hidrólise de peptídeos N^α-acilados. Aquela enzima que foi purificada a partir do fígado, pode libertar o aminoácido N^α-acetilado de peptídeos pequenos derivados de proteínas N^α-acetiladas (Tsunasawa et al., 1984). A especificidade do substrato é larga para o resíduo N-terminal. APH cliva o aminoácido N-terminal formilado ou acetilado de um peptídeo bloqueado (Jones et al., BBRC 126: 933 (1989)). Esta enzima catalisa a hidrólise de uma série de peptídeos e apresenta diferentes pHs óptimos para alguns substratos. Esta enzima pode também desempenhar um papel de charneira no processamento de cadeia polipeptídicas durante a biossíntese. A presença do grupo acetilado tem passado despercebida em muitas proteínas devido a na maior parte dos casos o grupo bloqueador da cadeia polipeptídica nascente juntamente com o primeiro aminoácido serem removidos por vezes durante a biossíntese. APH tem sido purificada a partir de fígado de rato (Tsunasawa et al., J. Biochem. 77: 89-102 (1975)); a partir

de fígado bovino (Gade et al., Biochim. Biophys. Acta 662: 86-93 (1981)); a partir de fígado de porco (Tsunasawa et al., J. Biochem. 93: 1217-1220 (1983)); a partir de cérebro de rato (Marks et al., J. Neurochem. 41: 201-208 (1983)); e a partir de eritrócitos humanos (Jones et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 126: 933-940 (1985)).

Sumário do invento

Este invento é dirigido a uma proteína Hidrolase de Peptídeos Acilados (APH), que é constituída pela sequência de aminoácidos da Figura 1. E também dirigido à produção de APH por tecnologia de DNA recombinante e à utilização de APH na hidrólise ou amino-acilação de peptídeos ou proteínas.

Uma molécula de DNA recombinante codificadora de APH do presente invento pode ser usada para transformar qualquer um de uma série de hospedeiro criando novas fontes e fornecimento ilimitados de APH. Constitui um objectivo deste invento proporcionar novas fontes de APH substancialmente pura que estarão disponíveis inesgotavelmente.

Ainda, este invento inclui o uso da enzima para catalisar a hidrólise de uma proteína N^α-acilada ou a reacção entre um dador de aminoácidos N^α-acetilados e uma proteína aceitadora com um grupo α-NH₂ livre.

Portanto, outros fins deste invento são proporcionar um meio de hidrólise de proteínas N-aciladas e de aminoacilação de qualquer polipéptideo ou proteína a partir de um dador de aminoácidos N^α-acetilados e de um acei-

tador com um grupo -NH_2 livre usando APH.

Descrição das Figuras

A figura 1 ilustra a sequência de aminoácidos de APH. As partes sublinhadas e a parte tracejada representam áreas sequenciadas pela degradação de Edman de APH tratado com tripsina e fragmentos obtidos com brometo de cianogênio e pelo método de sequenciação da terminação de cadeias didesoxi do cDNA do clone APH36.1. Os asteriscos indicam potenciais locais de glicosilação. A parte tracejada representa o sítio activo que contém uma serina e uma histidina.

A Figura 2 indica o peptídeo de APH a partir do qual se obtiveram as sequências de sondas degeneradas YS17.2 e YS20.1.

A Figura 3 ilustra o esquema de despiste de uma biblioteca de cDNA com sondas de modo a indentificar e isolar o gene codificador de APH.

A Figura 4 ilustre a sequência de DNA da inserção de DNA fágico do clone APH36.1, excluindo a sequência da albumina do soro de rato mais sequência 3' não traduzida do clone de fígado de rato APH36.1.

Nas Figuras 1 e 4 os aminoácidos foram designados por letra únicas do alfabeto do seguinte modo: A=Alanina, B=Acido Aspártico ou Asparagina, C=Cisteina, D=Acido Aspártico, E=Acido Glutâmico, F=Fenilalamina, G=Glicina, H-Histidina, I=Isobucina, K=Lisina, L=Leucina, M=Metionina, N=

=Asparagina, P=Prolina, Q=Glutamina, R=Arginina, S=Serina, T=Treonina, V=Valina, W=Triptofano, Y=Tirosina, Z=Glutamina ou Acido Glutâmico.

Discussão Detalhada do Invento

Definições

Para ajudar a compreensão de especificação e reivindicações, incluindo o âmbito em que são empregues tais termos, são dadas as definições que se seguem.

Transcrição. O processo de produção de mRNA a partir de um gene estrutural.

Tradução O processo de produção de um polipeptídeo a partir de mRNA.

Tradução. O processo de produção de um polipeptídeo a partir de mRNA.

Expressão. O processo a que é sujeito um gene estrutural para produzir um polipeptídeo. Consiste numa combinação de transcrição e tradução.

Plasmídeo. Uma molécula de DNA circular de cadeia dupla que não faz parte dos cromossomas de um organismo, contendo genes que conferem resistência a antibióticos específicos. Quando o plasmídeo é colocado num organismo unicelular as características daquele organismo podem ser alteradas ou transformadas como resultado da presença do DNA do plasmí-

deo. Por exemplo, um plasmídeo portador do gene de resistência à tetraciclina (Tet^R) transforma uma célula anteriormente sensível à tetraciclina numa que lhe é resistente. Uma célula transformada pelo por um plasmídeo é designada um "transformante".

Veículo de Clonagem: Um plasmídeo, DNA fágico ou outras sequências de DNA que sejam capazes de se replicarem numa célula hospedeira. O veículo de clonagem é caracterizado por um ou um pequeno número de locais de reconhecimento de endonucleases nos quais tais sequências de DNA podem ser cortados de determinado modo sem perda de uma função biológica essencial do DNA, que pode conter uma marca adequada para usar na identificação de células transformadas. As marcas, por exemplo, são de resistência à tetraciclina ou à ampicilina. Um veículo de clonagem é por vezes designado num vector.

Moléculas de DNA Recombinante ou DNA Híbrido. Uma molécula consistindo em segmentos de DNA de genomas diferentes que tenham sido ligados extremo fora das células e que tenham a capacidade de infectar célula hospedeira e nela mantidos.

Operador. Uma sequência de DNA capaz de interagir com o repressor específico, controlando assim a transcrição de gene(s) adjacente(s).

Promotor. Uma sequência de DNA à qual se liga a RNA polimerase que inicia assim a transcrição de um gene(s) adjacente(s).

Hidrolise de Peptídeos Acilados (APH). Este termo pretende incluir uma(s) hidrolase de peptídeos acilados de qual-



quer espécie, que tenha a actividade de libertar o aminoácido N^α-terminal acilado de qualquer proteína ou peptídeo num sistema in vivo ou in vitro. O termo hidrolase de peptídeos acilados é também usado neste invento para incluir qualquer análogo, homólogo, mutante ou derivado de uma hidrolase de peptídeo acilados natural que corte o aminoácido N^α-acetilado da parte N^α-terminal de um peptídeo ou proteína. O termo também pretende incluir fragmentos tendo menos aminoácidos do que a proteína natural como sejam fragmentos parciais de hidrolases de peptídeos acilados naturais que mantenham a actividade de clivagem de aminoácidos acilados do extremo N-terminal de um proteína ou peptídeo. O termo também é usado para incluir qualquer produto que compreenda a sequência de uma hidrolase de peptídeos acilados natural ou seu análogo, juntamente com um ou mais aminoácidos ladeantes, que apresente actividade ou hidrolase ou peptídeos acilados. O termo hidrolase de peptídeos acilados também inclui sinónimos tais como factor de libertação de aminoácidos acilados, enzima de libertação de aminoácidos acilados, hidrolase de peptídeos amino-acilados e acetilaminoacil-p-nitroanilidase.

Forma Substancialmente Pura. Como aqui é usado o termo "substancialmente puro" ou "substancialmente purificado" pretende descrever a proteína que está substancialmente livre de quaisquer compostos normalmente associados ao factor na sua fase natural. O termo pretende ainda descrever o factor que é homogéneo por uma ou mais características de pureza ou homogeneidade usadas pelos familiarizados com a matéria. Por exemplo, um factor substancialmente puro apresentará características constantes e reprodutíveis dentro de desvios experimentais convencionais de parâmetros tais como os que se seguem: peso molecular, técnicas de cromatografia e outros parâmetros. O termo no entanto não pretende excluir misturas artificiais ou sintéticas do factor com outros compostos. O termo não pretende excluir a presença de pequenas impurezas que não in-



terfiram com a actividade biológica do factor e que possam estar presentes, por exemplo, devido a purificação incompleta.

Produtos e Processos.

O invento compreende uma enzima tendo a sequência de aminoácidos apresentados na Figura 1, as sequências genéticas codificadoras da enzima, hospedeiros transformados com ela, produção de enzima por expressão em hospedeiros transformados e utilização da enzima na hidrólise ou na amino-acilação de peptídeos ou proteínas.

O peso molecular da APH de fígado de rato, conforme calculado por filtração em gel é 290.000-320.000. É constituída por quatro subunidades idênticas, com uma serina activa por subunidade. O extremo N^α-da APH é acilado. APH parece ser uma protease serina, com um sistema relay charge envolvendo serina, histidina e grupos carboxilo. O ambiente do sítio activo difere do de outras proteases da família da tripsina devido à presença de histidina. Apesar de APH apresentar uma larga especificidade para substratos, ela corta peptídeos contendo Ac-Ala-Ac-Ser e Ac-Met- (os resíduos N-terminais mais comuns) mais eficazmente do que outros dipeptídeos acilados. APH tem muito pouca ou nenhuma actividade com peptídeos contendo Ac-Trp-, Ac-Asp-, Ac-Glu, Ac-Arg-, Ac-Phe e Ac-Pro-.

A hidrolase de peptídeos acilados (APH) deverá ser distinguida da N^α-acetiltransferase, que catalisou a reacção em que uma proteína deita o grupo acetilo derivado de um acetil-Lo A (Tsunasawa et al., Methods in Embryology 106: 165-170 (1984)). A hidrolase de peptídeos acilados deverá também ser distinguida da Aminoacilase (Szajani; Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 15: 223-228 (1980)),

também conhecida como hidrolase de α -N-acilaminoácidos (Gade et al., Biochim et Biophys Acta 662: 86-93 (1981)).

Apesar da APH ter sido isolada e purificada a partir de várias fontes até à data não foi divulgada sequência de APH. O presente invento descreve essa sequência (Figura 1).

A sequência de DNA codificadora de APH pode ser derivada de várias fontes. Por exemplo, mRNA codificador de APH pode ser isolado a partir de tecidos de qualquer espécie que produza APH, usando o método de transferência Northern (Alwine et al, Method Enzymol. 68: 220-242 (1979)) e sondas de oligonucleotídeos marcados. O mRNA pode então ser convertido em cDNA por técnicas conhecidas dos familiarizados com a matéria. As sondas podem ser sintetizadas com base na sequência de aminoácidos conhecida de peptídeos de APH.

Como alternativa, sondas de DNA degenerativo podem ser usadas para fazer o despiste de uma biblioteca de DNA de uma espécie que produza APH, isolando assim um clone que contem a sequência de DNA codificadora de APH. A biblioteca de DNA é criada por fragmentação, usando uma ou mais endonucleases de restrição do DNA genômico, seguido da incorporação em vectores e sua utilização para transformar células hospedeiras as quais são então semeadas e despistadas.

A sonda de DNA pode ser marcada com um grupo detectável. Tal grupo detectável pode ser qualquer material tendo uma propriedade física ou química detectável. Tais materiais estão bastante desenvolvidos no campo dos imunoensaios e em geral qualquer marca útil em tais métodos pode ser aplicada no presente invento. São particularmente úteis os grupos enzimaticamente activo tais como enzimas (ver

Clin. Chem. 22: 1243 (1976)), substratos de enzimas (ver Esp. de Patente Britânica 1.548.741), coenzimas (ver Pat. U.S. Nº. 4.230.797 e 4.238.565) e inibidores de enzimas (ver Pat. U.S. Nº. 4.134.792); substâncias fluorescentes (ver Clin. Chem. 25: 353 (1979)); cromóforos; substâncias luminiscentes tais como quimioluminescentes e bioluminescentes (ver Clin. Chem. 25: 512 (1979)); especificamente ligandos; para pares inter-actuantes proximais; e radioisótopos tais como ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I e ^{14}C . Tais marcas e pares de marcação são detectados com base nas suas próprias propriedades físicas (e.g. substâncias fluorescentes, cromóforos e radioisótopos) ou as suas propriedades reactivas ou de ligação (e.g. enzimas, substratos, coenzimas e inibidores). Por exemplo uma sonda marcada com um cofactor pode ser detectada pela adição da enzima para a qual a marca é um cofactor e um substrato da enzima. Por exemplo pode-se usar uma enzima que actue num substrato para gerar um produto com uma propriedade física menscurável. Exemplos destas últimas incluem mas não estão limitadas à beta-galactonidase, fosfatase alcalina e peroxidase.

Uma sequência de DNA codificadora de APH pode ser recombinada com DNA vector de acordo com técnicas convencionais, incluindo extremos cegos ou protuberantes para ligação, digestão com enzimas de restrição para dar os extremos adequados, preenchimento dos extremos coesivos conforme adequado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar ligação indesejável e ligação com ligases adequados.

Para expressar APH são necessários sinais de transcrição e tradução reconhecidos por um elemento do hospedeiro adequado. Os hospedeiros eucarióticos podem ser células de mamífero capazes de serem cultivadas in vitro, particularmente leucócitos, mais particularmente células de mielona ou outros linfócitos transformados ou oncogénicos, e.g., células transformadas com EBV. Como alternativa podem ser empregues células que não sejam de mamífero, tais como bactérias, fungos, e.g. leveduras, fungos filamentosos ou simila-



res.

Hospedeiros possíveis para a produção de APH são células de mamífero, cultivadas in vitro em cultura de tecidos ou in vivo em animais. As células de mamífero podem proporcionar modificações pós-tradução às moléculas de APH incluindo enrolamento correcto ou glicosilação dos sítios certos. As células de mamíferos que podem ser úteis como hospedeiros incluem células de origem fibroblástica tais como VERO ou CHO-K1 ou células de origem linfóide, tais como o hibridoma SP2/O-AG14 ou o mieloma P3x63Sgh e seus derivados. Geralmente a construção APH fará parte de um vector tendo um sistema de replicação reconhecido pela célula hospedeira.

Numa execução preferida, uma célula procariótica é transformada por um plasmídeo portador do gene codificador de APH. Hospedeiros bacterianos de interesse particular E. coli K12 estirpe 294 (ATCC 31446), E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli W3110 (F⁻, lambda⁻, prototrófica (ATCC 27325)) e outras enterobactereáceas tais como Salmonella typhimurium ou Serratia marcescens e várias espécies de Pseudomonas. Em tais condições a APH não será glicosilada. O hospedeiro procariótico deve ser compatível com a replicação e sequências de controle presentes no plasmídeo de expressão. Um hospedeiro procariótico com um plasmídeo contendo o cDNA codificador de APH foi depositado em 21 de Agosto, 1987 na American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA e dado o número de acesso ATCC 67504.

Em geral tais vectores contendo replicação e sequências de controle derivadas de espécies compatíveis com uma célula hospedeira, são usados em ligação com o hospedeiro. O vector possui normalmente um sítio de replicação, assim como genes específicos que são capazes de proporcionar selecção fenotípica nas células transformadas. A expressão do DNA codificador de APH também pode ser colocada sob o controle de outras sequências reguladoras que podem ser

homólogas para o organismo no seu estado não transformado. Por exemplo, o DNA cromossômico de E. coli dependente de lac tase ou lac que medeia a utilização de lactose através da elaboração da enzima β -galactosidase. Os elementos de controle lac podem ser obtidos a partir do bacteriófago lambda plac5, o qual infecta E. coli. O sistema promotor-operador lac pode ser induzido por IPTG.

Também podem ser empregues outros sistemas promotor/operador ou suas partes. Por exemplo, podem ser usados colicina E1, galactose, fosfatase alcalina, triptofeno, xilose, tax e similares.

Para um hospedeiro mamífero existem disponíveis vários sistemas vectores para expressão. Uma classe de vectores utiliza elementos de DNA que proporcionam plasmídeos de replicação autónoma extracromossômica, derivados de vírus animais tais como vírus do papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus ou vírus SV40. Um segundo classe de vectores baseia-se na integração das sequências genéticas pretendidas no cromossoma hospedeiro. As células que possuem o DNA introduzido estávelmente integrado nos seus cromossomas podem ser seleccionados através da introdução uma ou mais marcas que permitem a selecção de células hospedeiras que contenham o vector de expressão. A marca pode proporcionar prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência e substâncias biocidas, e.g. antibióticos ou metais pesados, tais como cobre ou similares. O gene da marca seleccionável pode ser ligado directamente às sequências de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por co-transformação. Podem ainda ser necessários elementos adicionais para a síntese óptima de mRNA. Estes elementos podem incluir sinais de "splicing", assim como promotores da transcrição, potenciadores e sinais de terminação. Os vectores de expressão de cDNA que possuem tais elementos incluem os descritos por Okayama, H. Mol. Cel. Biol. 3: 280 (1983) e outros.

Pode ser empregue uma grande variedade de sequências reguladores da transcrição e tradução, dependendo da natureza do hospedeiro. Os sinais de transcrição e tradução podem derivar de fontes virais, como sejam adeno-vírus, vírus do papiloma bovino, vírus símio ou similares onde os sinais reguladores estão associados a um gene particular que possui um nível elevado de expressão. Como alternativa podem ser usados promotores de produtos de expressão de mamíferos, como seja actina, colagénio, miosina, etc. Os sinais de iniciação da transcrição podem também ser seleccionados de modo a permitir a repressão ou activação para se poder modular a expressão dos genes. São de interesse os sinais reguladores sensíveis à temperatura de modo a que variando a temperatura, a expressão possa ser reprimida ou iniciada, ou são sujeitos a regulação química, e.g. metabolito.

Uma vez preparado para expressão o vector ou sequência de DNA contendo as construções, estas podem ser introduzidas num hospedeiro adequado. Podem ser empregues várias técnicas, como seja fusão de protoplastos, precipitação com fosfato de cálcio, electroporação ou outras técnicas convencionais. Após fusão as células são cultivadas em meio e testadas relativamente as actividades adequadas. A expressão do(s) gene(s) resulta na produção de APH.

As células hospedeiras para produção de APH podem ser células imortalizadas, principalmente células de mieloma ou de linfoma. Estas células podem ser cultivadas num meio nutritivo adequado em frascos de cultura ou injectadas num hospedeiro sinérgico, e.g. murganho ou rato ou hospedeiro imunodeficiente ou local imunodeficiente de um hospedeiro, e.g. murganho labro ou a bolsa de hamster.

O APH do invento pode ser isolado e purificado de acordo com condições convencionais, como seja extração, precipitação, cromatografia, cromatografia de afi-

nidade, electroforese ou similares.

Utilizações

APH, uma vez produzida e purificada, pode ser usada, por exemplo, num ambiente de produção farmacêutica para hidrolisar um peptídeo N-acilado ou para amino-acilar o extremo N^o de um peptídeo. A primeira é efectuada numa solução aquosa e torna resistentes proteínas susceptíveis de Edman. A última pode ser efectuada num ambiente quase anidro e é útil para reduzir a degradação de proteínas a serem usadas terapêuticamente. Ver a discussão segundo A. Klibinov, "Unconventional Catalytic Properties of Conventional Enzymes" em Basic Biology of New Developments in Biotechnology, pág. 497-518 (A. Hollaender, ed. 1973) sobre a utilização de enzimas em sistemas bifásicos para síntese orgânica.

O ambiente quase anidro alterará a especificidade de APH para o substrato de tal forma que se dá a amino-acilação de peptídeos. A especificidade uma enzima para o substrato em solventes orgânicos pode ser radicalmente diferente, e muitas vezes oposta, à apresentada em água (ver Zaks et al. J. Am. Chem. Soc. 108: 2767-2768 (1986)). Demonstrou-se que os peptídeos podem ser sintetizados pela tripsina e α -quimotripsina em solventes miscíveis ou imiscíveis em água (ver Pugniere et al., Proteins: Structure, Function and Genetics 1: 134-138 (1986)). Lipases pancreática bovina, de levedura e de fungos filamentosos mostraram forte actividade catalítica numa série de solventes quase anidros. A actividade das lipases nos meios orgânicos depende do pH da solução aquosa a partir da qual é recuperada a lipase. A actividade máxima de lipase no solvente orgânico coincide com o pH óptimo da actividade enzimática em água (ver Zaks et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 3192-3196 (1985)). Demonstrou-se tam

bém que uma carboxipeptidase serina, como seja carboxipeptidase y derivada de levedura, pode sintetizar um peptídeo a partir da reacção de um éster ou amida de aminoácido ou outro substracto com um aminoácido ou outro componente com amina (Patente U.S. Nº. 4.339.534).

Enzimas tais como APH podem funcionar fortemente como catalisadores em solventes orgânicos desde que sejam seguidas algumas regras básicas. Estas regras incluem: (1) uma escolha adequada do solvente (sendo os hidro_fóbicos melhores se não removerem a fase essencial de água da molécula de enzima); (2) o uso de uma enzima recuperada a partir de uma solução aquosa com pH óptimo para a actividade enzimática; e (3) eliminação das limitações causadas por difusão através de agitação vigorosa e dispersão do pó de enzima no solvente orgânico (ver Zaks et al., 1986).

Os reagentes na reacção de condensação catalizada por APH são polipeptídeos aceitadores, e.g. proteínas com um grupo livre N^o-terminal e um substracto como seja um derivado de álcool benzílico de um aminoácido acilado. A concentração de substracto necessita de ser suficiente para deslocar a reacção no sentido de amino-acilação. O solvente escolhido é um que seja hidro_fóbico e que não remova a camada de moléculas de água essencial presente à volta da enzima. A APH, antes de ser colocada no solvente é recuperada a partir de uma solução aquosa com o pH óptimo para a actividade enzimática. A dispersão do pó fino de APH no solvente e agitação vigorosa é usada para ultrapassar as limitações da difusão (Zaks et al., J. Am. Chem. Soc. 108: 2767-2768 (1986)). Em adição, o ambiente orgânico facilitará a extracção da APH devido à insolubilidade da enzima em meios orgânicos (Zaks et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA 82: 3192-3196 (1985)).

APH pode ser suspensa na sua forma de pó fino hidratado ou pode ser imobilizada num veículo. A estabilidade das enzimas relativamente a agentes inactivantes

como sejam álcoois mono-hídricos é muitas vezes aumentada através da imobilização. Verificou-se que a tripsina e α -quimotripsina, quando imobilizadas num complexo insolúvel alumina-fosfocolamina, apresentam uma maior resistência a solventes orgânicos, incluindo álcoois mono-hídricos miscíveis em água (Pugniere et al., 1986): APH pode ser imobilizado, por métodos conhecidos dos familiarizados com a matéria, em esferas e outros veículos, os quais podem então ser usados em "batch" ou em colunas.

Tendo descrito este invento de uma maneira generalizada, o mesmo será melhor compreendido através da referência a exemplos específicos, os quais são aqui incluídos apenas com fins ilustrativos e não pretendem ser limitantes a menos que de outro modo seja especificado.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Extração e purificação de APH

Materiais - DEAE Sepharose CL-6B, colunas de FPLC (Mono Q HR5/5, e Mono SHR5/5), Sephacryl S-300 superfina, Octyl-Sepharose e Polybuffer 74 foram adquiridos à Pharmacia. A coluna de Sphe rogel CAA-HIC (0,46x10 cm) foi da Beckman. A hidroxilapatite (Biogel HT) foi da Bio-Rad. O glicerol foi da BRL. Reactigel 6X foi adquirido à Pierce. Os aminoácidos (Ac-L-Ala) foram da Sigma. Todos os outros produtos químicos foram grau reagente ou melhores.

Purificação da Enzima - APH foi purificada a partir de 300 g de fígado de rato (macho, estirpe CD) como descrito por Tsunasawa et al., J. Biochem. (Tokyo) 77: 89-102 (1975), excepto no que respeita à substituição de DEAE-celulose e Sepharose 6B, por DEAE-Sepharose CL-6B e Sephacryl S-300, respectivamente. Os tamanhos das colunas e gradientes foram também alterados. Para a cromatografia em hidroxilapatite, o gradiente de partida foi tampão de fosfatos 5mM em vez de fosfatos 20mM e usou-se 10% de glicerol no gradiente. Obtiveram-se 4 mg de enzima purificada. Durante a cromatografia em DEAE-Spharose CL-6B observou-se um aumento de actividade total. Para confirmar a homogeneidade da proteína saída da cromatografia em Sephacryl S-300, procedeu-se a cromatografia adicional: (i) cromatografia de permuta iónica com o sistema FPLC de Pharmacia em Mono Q e Mono S com vários tampões a pHs entre 5 e 8; (ii) cromatografia de interacção hidrofóbica em Octyl-Sepharose e Spherogel CAA-HIC; (iii) cromatofocagem em Mono P com Polybuffer 74; e (IV) cromatografia de afinidade usando Ac-L-Ala-Sepharose, preparado a partir de Reacti-Gel 6X (Pierce) e acetil-L-alanina. Em nenhum dos casos se observou melhor separação ou aumento de actividade..

Tabela I

Purificação da Hidrolase de Peptídeos Acilados a partir de Fígado de Rato

Passo	Actividade (unidades)	Proteína (mg)	Actividade específica (unidades/mg)	Rendimento %	Purificação
1 Homogenato	194	44200	0,00439	100	1,00
2 Sobrenadante de 12000 x g	194	39400	0,00492	100	1,12
3 Sulfato de amónio (20-50%)	150	25400	0,00591	77	1,35
4 Tratamento com calor	139	2520	0,0552	65	11,5
5 DEAE-Sepharose	208	29,3	7,10	108	1630
6 Hidroxilapatite	148	5,90	25,1	76	5780
7 Sephacryl S-300	118	4,04	29,2	61	6090

EXEMPLO 2

Sequenciação de aminoácidos de fragmentos tripticos e obtidos com brometo de cianogênio de APH e construção de sondas.

Este processo está ilustrado na parte esquerda da Figura 3.

Materiais - APH foi purificado como no Exemplo 1. A pureza foi confirmada por electroforese em gel de SDS e poliacrilamida pelo método de Laemmli, Nature 227: 680-685 (1970).

Brometo de cianogênio, guanidina-HCl, 2-mercaptoetanol e ácido trifluoroacético (TFA) foram adquiridos à Pierce. O acetonitrilo (grau para HPLC absorção de VV a 188 nm) foi da J.T. Baker. Tripsina tratada com N-tosil-FenCh₂Cl foi adquirida à worthington. O reagente de Bradform para ensaios de proteínas e os reagentes para electroforese foram adquiridos à Bio-Rad exceptuando os marcadores de peso molecular e Tris que foram adquiridos à Sigma. Zwittergent 3-14 foi da Calbiochem e o ácido iodoacético marcado com ¹⁴-C (9,8 mCi/mmol) foi obtido da New England Nuclear.

Todos os outros reagentes foram do grau de pureza maior disponível no mercado.

Redução de Ligações dissulfureto e alquilação com o ácido iodoacético

A APH (3 mmoles) foi desnaturada em 0,5 M Tris-HCl (pH 8,5) contendo 7 M guanidina-HCl/2 mM EDTA e reduzido com 8-10 mM 2-mercaptoetanol em atmosfera de

argon à temperatura ambiente durante 12 h ou a 37°C durante 3 h. A mistura 0,19 ml adicionaram-se [14 -C] ácido iodoacético (2,6 μ mol em 30 μ l 0,5 M tris-HCl (pH 8,5)/7 M guanidina HCl/2 mM EDTA) e a reacção decorreu durante 1 h a 37°C no escuro. Adicionou-se então 2-mercaptoetanol para uma concentração final de 0,2 M. Retirou-se o sal à proteína por precipitação com quatro volumes de acetona/metanol (3:1 v/v) ou por diálise contra 0,1 M ácido acético e liofilizou-se num concentrador/evaporador Savant.

Clivagem com brometo de cianogénio

A proteína carboximetilada foi dissolvida em ácido fórmico a 70% (0,1-0,2 ml) a que se adicionou 10-15 μ l de solução de CNBr (100 mg/ml em ácido fórmico a 70%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 24 h e seca sob vácuo após diluição com água. Os fragmentos peptídicos obtidos por clivagem com CNBr foram purificados por HPLC de fase reversa (RPLC) ou ainda fragmentados por digestão triptica.

Digestão com tripsina

Os peptídeos obtidos com CNBr foram dissolvidos em 0,2 ml de bicarbonato de amónio 0,2 M contendo 0,2% de Zwittergent 3-14 e digerida com tripsina (50 pmoles) tratado com N-tosil-FenCHCl₂ durante 20 h a 37°C. O produto de digestão foi seco sob vácuo e dissolvido em 6M guanidina-HCl em 0,1% TFA para purificação por RPLC.

Purificação de fragmentos peptídicos por HPLC de fase reversa

Os peptídeos foram purificados por RPLC num sistema de HPLC Beckman 344, usando uma coluna C₄ (Vydac, 0,46 × 25 cm, partículas de 10 microns com 300 Å de poro) para fragmentos obtidos com CNBr ou uma coluna Phenyl (Vydac, 0,46 × 25 cm, partículas de 5 microns com 300 Å de poro) para fragmentos tripticos. A mistura bruta de peptídeos foi aplicada à coluna equilibrada com 0,1% TFA e eluída com gradiente linear 0-80% de acetonitrilo em 0,1% TFA em 160 min com um caudal de 1 ml/min. A eluição foi controlada por absorvância a 214 nm e a 280 nm. Cada um dos picos foi colhido manualmente e, caso necessário, ainda purificado por RPLC isocrática usando a mesma coluna após ter sido seco e redissolvido em 0,2 ml de 6M guanidina-HCl-0,1% TFA. A concentração ótima de acetonitrilo para a separação dos peptídeos de cada uma das fracções foi calculada a partir do padrão de eluição da primeira HPLC (ver equação de Wong *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 7711-7715 (1985)).

Análise de aminoácidos

A hidrolase de peptídeos acilados foi extensivamente dialisada contra 0,1M ácido acético, liofilizado e hidrolisado a 110°C durante 24 h e 48 h em 6N HCl contendo 0,1% de fenol. A composição em aminoácidos foi determinada usando um Analizador de Aminoácidos Beckman 6300 (ver Hirs, Method. Enzymol. 11: 197-199 (1967)).

Sequenciação de Peptídeos

As análises das sequências peptídicas foram efectuadas usando um Sequenciador de Proteínas

Applied Biosystems 470 A e um Analisador de Pth Applied Biosystems 120 A (ver Hewick et al., J. Biol. Chem. 256: 7900-7997 (1981)).

Construção de sondas

Duas sondas oligonucleotídicas, YS20.1 e YS17.2 foram construídas a partir das sequências de aminoácidos de dois peptídeos. Ver Figura 2. As sondas foram sintetizadas com um sintetizador de DNA Applied Biosystems 380 A usando o método de fase sólida com base de sílica (Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191 (1981)) e o método da fosforarnidite de nucleosídeos activados com pro-
tões (Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981)). Os oligonucleotídeos purificados foram isolados a partir de misturas síntese brutas por PAGE e foram marcados com [^{32}P] ATP para uma actividade específica de 9×10^3 . YS17.2 YS20.1 representam conjuntos de oligonucleotídeos degenerados 128 vezes. Os conjuntos de YS17.2 e YS20.1 tinham 17 e 20 nucleotídeos de comprimento, respectivamente. As duas sondas sobrepoem-se 12 nucleotídeos, de tal forma que a utilização sequenciada das sondas para a despiste de uma biblioteca de DNA permite detectar eficazmente um pedaço de 25 nucleotídeos de DNA codificador de APH.

EXEMPLO 3

Criação e despiste da biblioteca de cDNA e sequenciação do cDNA codificador de APH.

Este processo está ilustrado na parte direita e na porção inferior da Figura 3.

Fígado de rato foi rapidamente congelado em N₂ líquido e descongelado em isotiocianato de guanidina e o RNA purificado por centrifugação através de CsCl (Chirgwin et al., Biochem. 18: 5294-5299 (1979)). RNA poli(A)⁺ foi seleccionado em oligo (dT)-celulose (Aviv et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 69: 1408-1412 (1972) e verificou-se estar intacto por transferência e hibridação com a sonda de cDNA da actina, pACT-1 (Spiegelman et al., J. Biol. Chem. 258: 10083-10089 (1983)).

O cDNA foi utilizado a partir de 10 µg de RNA poli(A)⁺ segundo o método de Okayama et al., MOL. Cell. Biol. 2: 161-170 (1982), conforme modificado por Gubler et al., Gene 25: 263-269 (1983). O cDNA foi ligado a adaptadores EcoRI após os extremos do cDNA terem sido tornados cerosos com DNA-polimerase de T4 e os sítios EcoRI internos terem sido metilados. O cDNA foi então digerido com excesso de ECORI e cromatografado em Sepharose CL-4B. O cDNA superior a 500 pb foi reunido e ainda fraccionado num gel de 0,8% de agarose em tampão tris-borato. O cDNA com migração superior a 2 kb foi colhido com papel NA-45 (Schleicher & Schuell). Dez µg de DNA de gt 11 desafosforilado (ver Yong et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80: 1194-1198 (1983)) foi ligado a 100 µg de cDNA do tamanho seleccionado em 20 µl e encapsidado in vitro (ver Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1982)). E. coli estirpe Y1088 foi infectada com o fago recombinante e a biblioteca foi semeada para despiste.

Inicialmente, 450.000 clones foram semeados e despistados usando YS20.1. Das 450.000 placas observaram-se 27 placas positivas em duplicado. Doze destas 27 foram isoladas e purificadas e depois despistadas usando YS 17.2. Das 12 apenas se observou 1 placa verdadeiramente posi-

tiva. Este clone foi designado APM 5.2. Para confirmar que a inserção de cDNA em APH 5.2 codificava de facto APH, sequenciou-se a região do sítio de hibridação oligo pelo método de terminação de cadeia didesoxinucleotídicas (ver Sanger et al., J. Mol. Biol. 94: 441-448 (1975)). A tradução da sequência produziu a sequência peptídica idêntica à que serviu para a programação das sondas oligonucleotídicas.

A inserção de cDNA no clone APH 5.2 verificou-se ter ~1,3 kb por análise com enzimas de restrição. Para se obter uma estimativa do comprimento do gene de APH, usou-se o método de "chromosome walking" para se obter uma sonda maior, a qual foi então usada para hibridar com um mRNA codificador de APH numa transferência Northern. Com base num mapa de restrição parcial de APH 5.2, seleccionou-se um fragmento Kpn-XmnI de 660 pb. Obtiveram-se sondas marcadas radioactivamente por "nicktranslation" e usaram-se para fazer o despiste de mRNA de tecido de rato, preparado de acordo com o processo de transferência Northern (Alwine et al., (1979)). A sonda de 660 pb hibridou com um único mRNA de ~2,9 kb de tamanho.

Devido ao fragmento de 1,3 kb do clone APH 5,2 ser consideravelmente mais pequeno do que o mRNA de 2,9 kb usou-se o fragmento de 660 pb para fazer novamente o despiste da biblioteca de cDNA de fígado de rato. Dos 1,1 milhões de clones semeados observaram-se 15 placas positivas em duplicação. Treze daqueles clones isolados e o DNA fágico isolado. A cadeia mais longa tinha uma inserção de cDNA de 2,5 kb e foi designado APH36.1.

O DNA fágico de APH36.1 foi purificado e sequenciado. A estratégia de sequenciação incluiu a subclonagem dos fragmentos de restrição da inserção de cDNA do APH36.1 em M13 mutantes de deleção gerados pela Exonuclease III, ou oligonucleotídeos iniciadores para sequenciação hibridados com regiões de sequência específicas do cDNA.

A sequência traduzida do extremo 5' do cDNA de APH36.1, i.e., os primeiros 40 aminoácidos, mostrou-se idêntica à sequência de aminoácidos da albumina do soro de rato. Portanto, APH36.1 era um clone misto contendo apenas 2,5 kb de cDNA codificador de APH.

A Figura 1 ilustra a sequência traduzida do cDNA de APH36.1 sem a sequência da albumina do soro de rato. As sequências sublinhadas e tracejadas são as sequências obtidas por sequenciação dos fragmentos tríplicos e obtidos com brometo de cianogênio de APH. O sítio activo está assinalado pela área a tracejado e cada um dos anteriores as-teriscos indica um sítio possível de glicosilação.

Uma vez que cada uma das subumida-des de APH tem um peso molecular de 80.000 ou aproximadamen-te 700-755 resíduos de aminoácidos e uma vez que a sequência codificadora de APH do clone APH36.1 constitui 2184 pares de bases (i.e., 728 aminoácidos), "chromosome walking" adicional permitiria encontrar o extremo 5' do gene codificador de APH. Para tal, uma biblioteca comercial de cDNA de fígado de rato em lambda-gt11 da Clontech (HRZ1001) contendo $6,8 \times 10^5$ clo-nes independentes e uma inserção média de 1,1 Kb, foi despis-tada com sondas marcadas radioactivamente criadas a partir do fragmento Bam 2-PatI do extremo 5' da sequência codifica-dora de APH do clone APH36.1. Clones contendo a sequência 5' prolongada foram isolados e o DNA fágico purificado. A sequenciação do DNA fágico é feita pelo método de terminação de ca-deias didesoxi (Sanger et al., 1975). O extremo 3' da sequên-cia traduzida é identificado pela localização do códon de pa-ragem (marcado com um asterisco).

A sequência que falta do extremo 5' da região codificadora da Hidrolase de peptídeos acilados é determinada por análise por extensão com iniciador do mRNA da hidrolase de peptídeos acilados. Um oligonucleotídeo sinté-tico complementar do extremo 5' da região codificadora de APH

36.1 foi para iniciar a síntese de uma cadeia de cDNA. O molde nesta reacção foi RNA poli A⁺ celular total ou mRNA enriquecido em mensageiro da hidrolase de peptídeos acilados por selecção prévia de híbridos. A cadeia de cDNA sintetizada deste modo foi directamente sequenciada pelo método químico de Maxam e Gilbert (Maxam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564 (1977)).

Apesar do que foi descrito se referir a execuções particulares preferidas, compreende-se que o presente invento não lhes esteja limitado. Os familiarizados com a matéria verão facilmente que podem ser feitas várias modificações às execuções divulgadas e que tais modificações pretendem-se inseridas no âmbito do presente invento.

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a preparação de hidrolase de peptídeos acilados ("APH") numa forma substancialmente pura, caracterizado por se incluir na referida hidrolase a sequência de aminoácidos descrita na Figura 1.

1 VLLSETPQEA

51 ALYRGLSRQP ELBAACLGPZ VTTQYCGLYR TVHTWTQRD LERKENIRFC

101 RQYLVFEDGD SVYFAGPACH SVETRCELLS RESPSGTMKA VLKAGGTVS

151 GEKQFLEVY EDGRCLKSFN LEALEKHGPV YEDDCFGCLS WSHSETHLLY

201 VAEIOGPKAE EFFRTKALDI SASDDEMARP KCPDQAIKGD QFVFTEDWGE

251 TMVKSIPVL CYLDIDSGNI SVLEGVPERV SPCQAFWAPG DTGVTVGVY

301 HEPFLGIRY CTMRSALYY VDLSCGKCEL LSDGSLAICS PRLSPDQCRI

351 VYLQYPC LAP HHQCSQLCLY DWYTKVTSVV VDIVPRLGE SFSGIYCSLL

401 PLGCSADSQ RVVFDASQRS RQDLFAVDIQ TGSITELTAA GSAGSWLLT

451 IDKDLVAQF STPELPPSLK VGFLPPPCKE QSVSTVSLLE AEPICGHWG

501 VRVLHPPPDQ ENVQYADLDF EAILLQPSNP PDKTQVPMVV MPHGGPSSSF

551 VTAVMLFPAM LCMGFAVLL VNYRGSTGFG QDSILSLPCN VGHQDVYDVQ

601 FAVEQVLQEE EFDARRVALM GSGHGGFLSC ELIGQYPETY SACIARNPVI

651 NIASMGSTD IPDWCVETG FPYNSCLPD LNVWEMLDK SPIKYIPQVK

701 TPVLLMLGQE DRRVPFKQGM EYTRALKARN VPVRLILYPK SNHALSEVEA

751 ESDSFMQAVL WLETHLGS

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter hidrólise de peptídeos acilados sem glicosilação nativa.

3ª. - Processo para a preparação de uma molécula de DNA recombinante caracterizado por se incluir na referida molécula em sequência genética codificadora de hidrolase de peptídeos acilados.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a referida sequência genética codificar APH de mamífero.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o referido mamífero ser ratazana.

6ª. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 4, caracterizado por a referida sequência genética estar na forma de cDNA.

7ª. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-5, caracterizado por a referida molécula ser um vector.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o referido vector ser um plasmídeo.

9ª. - Hospedeiro caracterizado por ter sido transformado com a molécula de DNA recombinante obtida de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5.

10ª. - Hospedeiro de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ser uma bactéria.

11ª. - Hospedeiro de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ser uma levedura.

12ª. - Hospedeiro de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ser uma célula de mamífero.

13ª. - Processo para a produção de hidrolase de peptídeos caracterizado por compreender:

(a) obtenção da molécula de DNA de qualquer uma das reivindicações 3, 4 ou 5;

(b) a inserção da referida molécula de DNA num vector;

(c) a transformação de um sistema hospedeiro com o referido vector;

(d) a expressão da referida sequência de DNA de APH da referida molécula de DNA recombinante no referido hospedeiro; e

(e) recuperação da APH produzida pela referida expressão.



14ª. - Método de hidrólise de aminoácidos acilados na terminação N de um polipeptídeo acilado caracterizado por se fazer contactar o referido polipeptídeo com a APH obtido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2.

15ª. - Método de catálise da reacção entre um dador derivatizado aminoácido N α -acetilado e um aceitador com um α -NH₂ livre caracterizado por se fazer contactar o referido dador com o referido aceitador na presença da APH obtido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2.

16ª. - Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a referida catálise ser efectuada num meio quase anidro.

17ª. - Processo de acordo com qual
quer uma das reivindicações 1, 2 ou 14, caracterizado por se
obter uma enzima na forma imobilizada.

Lisboa, 18 de Agosto de 1988



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

1/10

Figura 1

Sequência proteica

1 VLLSEPQAAA
51 ALYRGLSRQP SLAACLGP VTTQYGGLYR TVHTEWTQRD LERMENIRFC
101 RQYLVFHDGD SVVFAGPAGN SVETRGELLS RESPSGTMKA VLRKAGGTVS
151 GEEKQFLEWV EKNRKLKSFN ^{*}LSALEKHGPV ^{**}YEDDCFGCLS WSHSETHLLY
201 VAEKKRPKAE SFFQTKALDI SASDDEMARP KKPDQAIKGD QVFYEDWGE
251 TMVSKSIPVL CVLDIDSGNI ^{**}SVLEGVPENV ^{*}SPGQAFWAPG DTGVVFGWW
301 HEPFRLGIRY CTNRRSALYY VDLGGKCEL LSDGSLAICS PRLSPDQCRI
351 VYLQTPCLAP HHQCSQLCLY DWYTKVTSVV VDIVPRQLGE SFSGIYCSLL
401 PLGCWSADSQ RVVFDSAQRS RQDLFAVDQ TGSITSLTAA GSAGSWKLLT
451 IDKDLMVAQF STPSLPPLK VGFLPPPGKE QSVSWVSLEE AEPPIGIHWG
501 VRVLHPPPDQ ENVQYADLDF EAILLQPSNP PDKTQVPMVV MPHGGPHSSF
551 VTAWMLFPAM LCKMGFAVLL VNYRGSTGFG QDSILSLPGN VGHQDVKDQV
601 FAVEQVLQEE HFDARRVALM GSGHGGFLSC HLIQYPETY SACIARNPVI
651 NIASMMGSTD IPDWCMVETG XXXXXXXXFPYSNSCLPD LNVWEEMLDK SPIKYIPQVK
701 TPVLLMLGQE DRRVPFKQGM EYYRALKARN VPVRLLLYPK SNHALSEVEA
751 ESDSFMNAVL WLHHLGGS

FIG.1

Figura 2

Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do peptídeo APH 18-11-13C

YS20.1

YS17.2

(Arg)-Val-Leu-His-Pro-Pro-Asp-Gln-Glu-Asn-Val-Gln-Tyr-Ala-Asp-Leu-Asp-Phe-Glu-Ala-Ile-Leu-Leu-Gln
(CGT)-GTG-CTA-CAC-CCA-CCT-CCA-GAC-GAG-AAT-GTA-CAA-TAT-GCT-GAC-CTT-GAC-TTT-GAA-GCA-ATC-CTT-TTG-CAG

2/10

FIG. 2

11

Figura 3



3/10

Estratégia de clonagem da hidrolase
de peptideos acilados

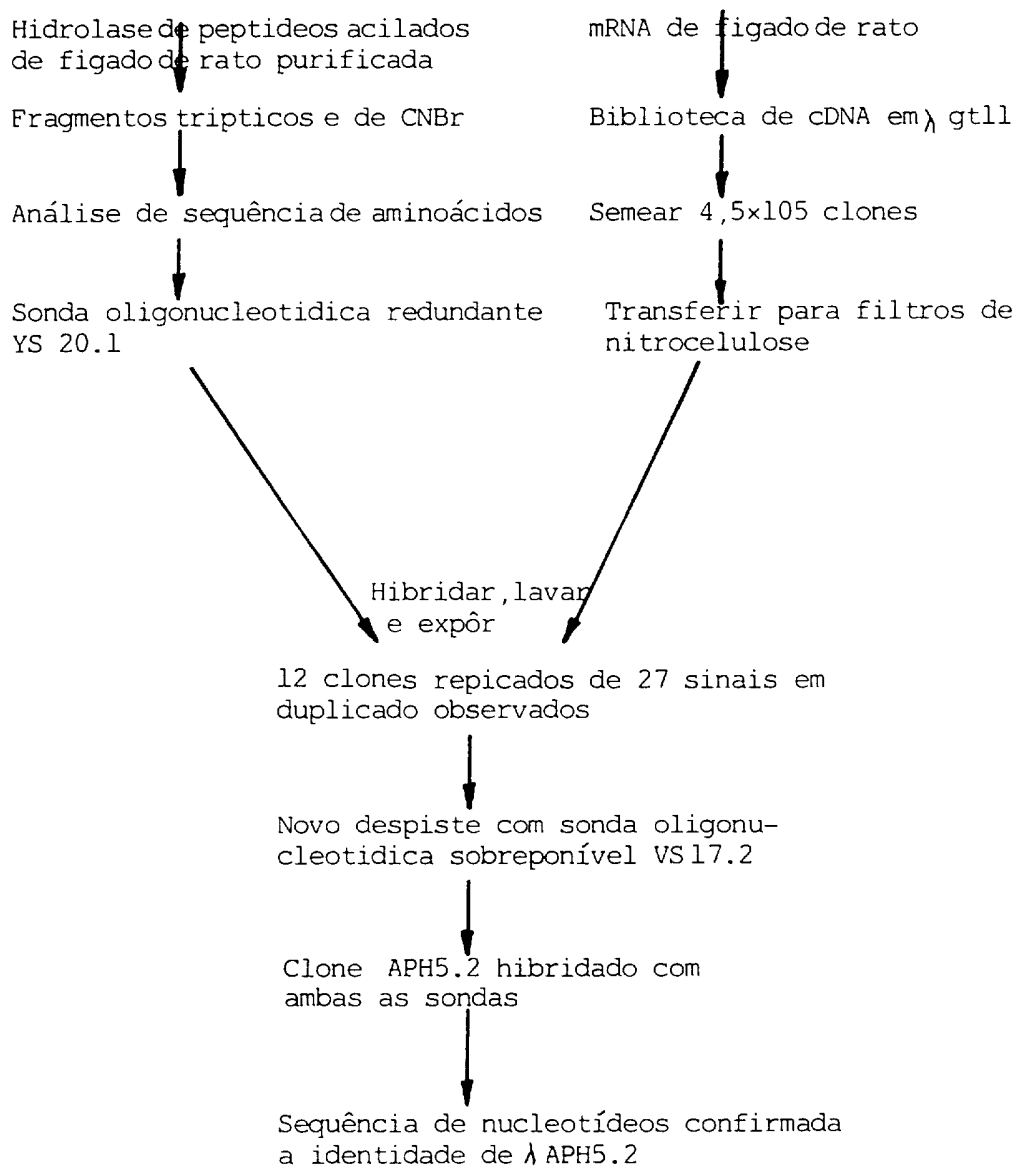


FIG. 3

Figura 4



4/10

```

121 TGTGCTGCTGAGTGAGCCCCAGGAGGCGGCAGCGCTGTACCGGGGCCTTAGCCGCCAGCC 180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACACGACGACTCACTCGGGGTCTCTCGCCGTCGCGACATGGCCCCGGAATCGGCGGTCCG
V L L S E P Q E A A A L Y R G L S R Q P

181 TTCGCTGAGCGCCGCTGCCTGGGTCCGGAGGTCAACACGCAGTATGGGGGCCTCTATCG 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGCGACTCGCGCGGACGGACCCAGGCCTCCAGTGGTGCCTCATACCCCGGAGATAGC
S L S A A C L G P E V J T Q Y G G L Y R

241 GACCGTGCCACTGAGTGGACTCAGAGGGACTTGGAGCGAATGGAGAACATCCGATTCTG 300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGGCAGTGTGACTCACCTGAGTCTCCCTGAACCTCGCTTACCTCTTGTAGGCTAAGAC
T V H T E W T Q R D L E R M E N I R F C

301 CCGCCAGTACCTAGTGTTTCATGACGGAGACTCGGTGGTGTGTTGCCGGGCCTGCAGGCAA 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCGGTGATGATCACAAGTACTGCCTCTGAGCCACCACAAACGGCCCCGGACGTCCGTT
R Q Y L V F H D G D S V V F A G P A G N

361 CAGTGTGGAACCCGGGGGGAGCTGCTGAGCAGAGAGTCTCCTTCAGGCACCATGAAAGC 420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCACACCTTTGGGCCCCCTCGACGACTCGTCTCTCAGAGGAAGTCCGTGGTACTTTTCG
S V E T R G E L L S R E S P S G T M K A

421 TGTGCTTCGCAAGGCCGGAGGCACAGTCTCAGGAGAGGAAAAACAGTTCTTGGAGGTCTG 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACACGAAGCGTTCCGGCCTCCGTGTCAGAGTCTCTCTCTTTTGTCAAGAACCTCCAGAC
V L R K A G G T V S G E E K Q F L E V W

```

FIG. 4

Figura 4A



5/10

481 GGAGAAGAACCGGAAGCTCAAGAGTTTCAACCTGTCAGCGCTGGAGAAGCATGGGCCTGT 540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTCTTCTTGGCCTTCGAGTTCTCAAAGTTGGACAGTCGGACCTCTTCGTACCCGGACA
E K N R K L K S F N L S A L E K H G P V

541 CTATGAGGATGACTGCTTTGGCTGCCTTTCCTGGTCACACTCAGAGACACACTTGTGTGA 600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATACTCCTACTGACGAAACCGACGGAAAGGACCAGTGTGAGTCTCTGTGTGAACAACAT
Y E D D C F G C L S W S H S E T H L L Y

601 TGTGGCGGAGAAGAAGCGTCCCAAGGCTGAGTCCTTCTTTCAGACCAAAGCCTTGGACAT 660
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACACCGCCTCTTCTTCGCAGGGTCCGACTCAGGAAGAAAGTCTGGTTTCGGAACCTGTA
V A E K K R P K A E S F F Q T K A L D I

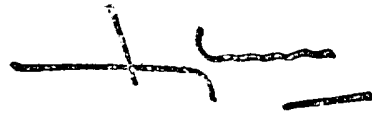
661 CAGTGCCAGCGATGATGAGATGGCCAGGCCGAAGAAGCCAGACCAGGCCATCAAGGGGGA 720
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCACGGTCGCTACTACTCTACCGGTCCGGCTTCTTCGGTCTGGTCCGGTAGTTCCCCCT
S A S D D E M A R P K K P D Q A I K G D

721 CCAGTTTGATTTTATGAAGACTGGGGAGAAACGATGGTTTCCAAAAGCATCCCTGTGCT 780
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCAAACATAAAATACTTCTGACCCCTCTTGTACCAAAGGTTTTCTAGGGACACGA
Q F V F Y E D W G E T M V S K S I P V L

781 CTGCGTGCTAGATATCGACAGTGGCAACATCTCTGTGCTTGAGGGAGTCCCTGAAAATGT 840
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACGCACGATCTATAGCTGTACCGTTGTAGAGACACGAACTCCCTCAGGGACTTTTACA
C V L D I D S G N I S V L E G V P E N V

FIG. 4A

Figura 4B



6/10

841 GTCACCTGGTCAGGCTTTTTGGGCCCCCTGGAGACACGGGGTGGTGTGTGGGCTGGTG 900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAGTGGACCAGTCCGAAAAACCCGGGGACCTCTGTGCCCCCACCACAAACACCCGACCAC
S P G Q A F W A P G D T G V V F V G W W

901 GCATGAACCCCTTCAGGCTCGGCATCCGCTATTGCACCAATCGCAGATCAGCTCTGTACTA 960
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTACTTGGGAAGTCCGAGCCGTAGGCGATAACGTGGTTAGCGTCTAGTCGAGACATGAT
H E P F R L G I R Y C T N R R S A L Y Y

961 TGTGGACCTGAGCGGAGGGAAGTGGAAGTCTCGGATGGTTCCCTGGCCATCTGTTT 1020
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACACCTGGACTCGCCTCCCTTCACACTTGATGAGAGCCTACCAAGGGACCGGTAGACAAG
V D L S G G K C E L L S D G S L A I C S

1021 TCCTCGGCTCAGCCCAGACCAGTGTGCGATCGTCTACCTACAGTATCCATGTCTAGCCCC 1080
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGAGCCGAGTCCGGTCTGGTCACAGCGTAGCAGATGGATGTCATAGGTACAGATCGGGG
P R L S P D Q C R I V Y L Q Y P C L A P

1081 TCATCACCAATGCAGCCAGCTCTGCCTGTACGACTGGTACACCAAGGTCACCTCAGTGGT 1140
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTAGTGGTTACGTCCGTGAGACGGACATGCTGACCATGTGGTTCCAGTGGAGTCACCA
H H Q C S Q L C L Y D W Y T K V T S V V

1141 GGTGGACATTGTACCCCGGCAGCTGGGAGAGAGCTTCTCTGGAATCTACTGCAGTCTTCT 1200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCACCTGTAACATGGGGCCGTGACCCCTCTCTCGAAGAGACCTTAGATGACGTGAGAAGA
V D I V P R Q L G E S F S G I Y C S L L

FIG. 4B

Figura 4C



7/10

1201	TCCTTTGGGATGCTGGTCAGCTGACAGCCAGAGAGTAGTCTTTGACTCTGCCCAGCGCAG ----- AGGAAACCCTACGACCAGTCGACTGTCGGTCTCTCATCAGAACTGAGACGGGTGCGCTC P L G C W S A D S Q R V V F D S A Q R S	1260
1261	TCGGCAGGACCTGTTTGCTGTGGACACCCAGACGGGCAGCATCACCTCCCTGACAGCTGC ----- AGCCGTCCTGGACAAACGACACCTGTGGGTCTGCCCGTCGTAGTGGAGGGACTGTCGACG R Q D L F A V D T Q T G S I T S L T A A	1320
1321	GGGGTCAGCAGGAAGCTGGAAGCTGCTTACAATTGACAAAGACCTTATGGTTGCCCACTT ----- CCCCAGTCGTCCTTCGACCTTCGACGAATGTTAACTGTTTCTGGAATACCAACGGGTCAA G S A G S W K L L T I D K D L M V A Q F	1380
1381	CTCCACACCCAGTTTGCCCCCAAGCCTGAAAGTTGGGTTCTGCCTCCTCCTGGGAAGGA ----- GAGGTGTGGGTCAAACGGGGTTCTGGACTTTCAACCCAAGGACGGAGGAGGACCTTCTCT S T P S L P P S L K V G F L P P P G K E	1440
1441	GCAGTCTGTGTCATGGGTGTCCCTGGAGGAGGCTGAACCTATTCTGGCATCCACTGGGG ----- CGTCAGACACAGTACCCACAGGGACCTCCTCCGACTTGGATAAGGACCGTAGGTGACCCC Q S V S W V S L E E A E P I P G I H W G	1500
1501	CGTCCGTGTGCTACACCCACCTCCAGACCAAGAGAATGTACAATATGCTGACCTTGACTT ----- GCAGGCACACGATGTGGGTGGAGGTCTGGTTCTCTTACATGTTATACGACTGGAACCTGAA V R V L H P P P D Q E N V Q Y A D L D F	1560

FIG. 4C

8/10

FIG. 4D

Figura 4E



9/10

1561 TGAAGCAATCCTTTTGCAGCCCAGCAATCCTCCAGATAAGACCCAGGTCCCCATGGTAGT 1620
-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCGTTAGGAAAACGTCGGGTCGTTAGGAGGTCTATTCTGGGTCCAGGGGTACCATCA
E A I L L Q P S N P P D K T Q V P M V V

1621 CATGCCCCATGGGGGACCCCATTCGTCCTTCGTCACTGCCTGGATGCTGTTCCAGCCAT 1680
-----+-----+-----+-----+-----+
GTACGGGGTACCCCTGGGGTAAGCAGGAAGCAGTGACGGACCTACGACAAGGGTCGGTA
M P H G G P H S S F V T A W M L F P A M

1681 GCTCTGCAAGATGGGCTTTGCAGTacttctggtgaactatcgtggctccactggctttgg 1740
-----+-----+-----+-----+-----+
CGAGACGTTCTACCCGAAACGTCatgaagaccacttgatagcaccgaggtgacggaacc
L C K M G F A V L L V N Y R G S T G F G

1741 ccaagacagcatcctttctctcccaggcaatgtgggccaccaggatgtgaaggatgtcca 1800
-----+-----+-----+-----+-----+
ggttctgtcgtaggaagagaggggtccgttacacccgggtggtcctacacttctacaggt
Q D S I L S L P G N V G H Q D V K D V Q

1801 gtttGCAGTGGAGCAGGTACTCCAGGAGGAACACTTTGATGCAAGACGCGTGGCCCTTAT 1860
-----+-----+-----+-----+-----+
caaaCGTCACCTCGTCCATGAGGTCCTCCTTGTAAGACTACGTTCTGCGCACCGGGAATA
F A V E Q V L Q E E H F D A R R V A L M

1861 GGGTGGTTCCTATGGTGGGTTCTCTCCTGCCACCTGATTGGTCAATACCCGGAGACCTA 1920
-----+-----+-----+-----+-----+
CCCACCAAGGGTACCACCCAAGGAGAGGACGGTGGAATAACCAGTTATGGGCTCTGGAT
G G S H G G F L S C H L I G Q Y P E T Y

FIG. 4E

FIG. 4F