



(11) **Número de Publicação:** PT 731843 E

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6)

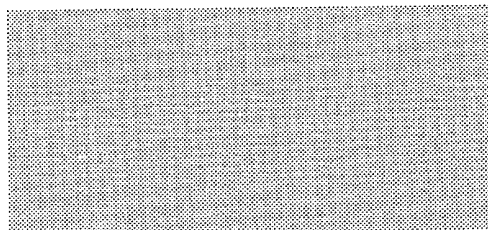
C12N015/62 A C12N015/53 B
C12N015/12 B C12N009/02 B
C07K014/47 B C12P017/00 B

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

<p>(22) Data de depósito: 1994.11.08</p>	<p>(73) Titular(es): LARGE SCALE BIOLOGY CORPORATION SUITE 1000, 3333 VACA VALLEY PARKWAY VACAVILLE, CA 95688 US</p>
<p>(30) Prioridade: 1993.11.12 US 152483</p>	
<p>(43) Data de publicação do pedido: 1996.09.18</p>	<p>(72) Inventor(es): DELLA-GIOPPA, GUY US MONTTO H. KUMAGAI US</p>
<p>(45) Data e BPI da concessão: 2001.08.16</p>	<p>(74) Mandatário(s): JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT</p>

(54) **Epígrafe:** ENZIMA DE FUSÃO TIROSINASE-PROTEÍNA ACTIVADORA

(57) **Resumo:**



PTE 731843



DESCRIÇÃO

"ENZIMA DE FUSÃO TIROSINASE-PROTEÍNA ACTIVADORA"

A presente invenção é uma continuação em parte do pedido com o n.º de Série 7/857.602, depositado em 30 de Março de 1992. A presente invenção é também uma continuação em parte do pedido com o n.º de Série 923.692 depositado em 31 de Julho de 1992, o qual é uma continuação em parte dos pedidos com o n.º de Série 600.244, depositado em 22 de Outubro de 1990, com o n.º de Série 641.617, depositado em 16 de Janeiro de 1991 e com o n.º de Série 737.899 depositado em 26 de Julho de 1991. O n.º de Série 600.244 é uma continuação em parte do pedido com o n.º de Série 310.881, depositado em 17 de Fevereiro de 1989, agora abandonado, que é uma continuação em parte dos pedidos com os n.ºs de Série 160.766 e 160.771, ambos depositados em 26 de Fevereiro de 1988 e agora abandonados. O n.º de Série 641.617 é uma continuação do pedido com o n.º de Série 347.637, depositado em 5 de Maio de 1989, agora abandonado. O n.º de Série 737.899 é uma continuação do pedido com o n.º de Série 363.138, depositado em 8 de Junho de 1989, agora abandonado, que é uma continuação em parte do pedido com o n.º de Série 219.279, depositado em 15 de Julho de 1988 e agora abandonado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A melanogénese, ou seja a produção do polímero biológico melanina, é um fenómeno amplamente difundido na natureza e que ocorre na maioria dos ramos, desde os fungos aos mamíferos. Os pigmentos negros, castanhos, amarelos claros e azuis irisados que se encontram em penas, pelos, olhos, cutículas de insectos, frutos e sementes são normalmente melaninas. Tem sido atribuído às melaninas uma função fotoprotectora na pele, sendo desconhecida a sua função no olho e no ouvido interno. As melaninas também se encontram no cérebro dos mamíferos onde são



referidas como neuromelaninas. A função biológica das neuromelaninas é desconhecida.

A biossíntese passo a passo da melanina é representada na Figura 1. A tirosinase (E.C. 1.14.18.1) catalisa dois tipos de reacções implicadas na biossíntese da melanina: a orto-hidroxilação de monofenóis a catecóis, que é referida como actividade de creolase, e a desidrogenação de catecóis a o-quinonas, designada como actividade de catecolase. Para a reacção de hidroxilação é utilizado oxigénio molecular. Por esta razão, a tirosinase na sua acção sobre um monofenol é referida como uma "oxidase de função mista". Hayaishi, em "Biological Oxidation" (Singer, ed.) p. 581, Interscience Publishers, Nova Iorque (1968). Na acepção que lhe é dada na presente descrição, o termo tirosinase refere-se a todas as enzimas que possuem a actividade enzimática atrás descrita. As tirosinases são também por vezes referidas como oxidases de polifenol.

Conforme se pode observar a partir do esquema das vias biossintéticas apresentadas na Figura 1, a tirosinase é essencial para a produção de melanina. Por conseguinte, a capacidade de um organismo de expressar quantidades significativas de actividade de tirosinase é essencial para a produção in vivo no organismo de melanina.

Não ocorre tirosinase naturalmente em todos os organismos. Pelo contrário, verificou-se que a tirosinase ocorre num número relativamente limitado de procariontes, está ausente numa variedade de plantas superiores e está geralmente confinada a células específicas da pele nos animais superiores, mas pode ocorrer também em tecidos interiores, tais como a substantia nigra, os olhos e o ouvido interno. Dado o número limitado de organismos que produzem melanina, um objectivo da presente invenção é proporcionar um meio para a introdução de actividade de tirosinase em organismos que seriam de outro modo incapazes de produzir melanina.



Mesmo nos organismos em que ocorre naturalmente actividade de tirosinase, esta actividade está em geral presente a níveis reduzidos. Como resultado, a melanina é em geral produzida em pequenas quantidades pelos organismos que possuem actividade de tirosinase. É por conseguinte um objectivo adicional da presente invenção proporcionar um meio para intensificar o nível da actividade de tirosinase em organismos a fim de intensificar a produção in vivo de melanina.

Várias referências da técnica anterior ensinam como manipular geneticamente um organismo para que este adquira actividade de tirosinase. No Pedido de Patente US com o n.º de Série 7/857.602, depositado em 30 de Março de 1993, os requerentes descrevem um método para a produção de melanina a partir de microorganismos transformados em que uma sequência que codifica para tirosinase é introduzida num organismo. Os microorganismos que foram manipulados geneticamente para intensificar as respectivas capacidades para a produção de tirosinases incluem, não se limitando a estas, espécies de Streptomyces, Escherichia, Bacillus, Streptococcus, Salmonella, Staphylococcus e Vibrio. Por exemplo, demonstrou-se que genes de tirosinase clonados a partir de Streptomyces sp. produzem pigmentos de melanina em cultura. J. Gen. Microbiol. 129:2703-2714 (1983); Gene 37:101-110 (1985). Os genes clonados foram também expressos em Streptomyces e E. coli. della-Cioppa, Bio/Technology 8:634-638 (1990). Em todos os casos, é necessário tanto tirosinase como ORF438 para a produção de melanina.

A Patente US n.º 4.898.814 concedida a Kwon dá a conhecer um clone de ADNc de tirosinase humana e reivindica um método para preparar tirosinase humana por meio da expressão do ADNc em E. coli.

Muitas formas de tirosinase de bactérias, tais como Streptomyces, necessitam de uma proteína activadora. Por exemplo, verificou-se que o local mel de S. antibioticus contém



dois quadros de leitura livres (*open reading frames*, ORF's) que codificam para uma proteína putativa ORF438 ($M_r=14.754$) e tirosinase ($M_r=30.612$). Pensa-se que a proteína ORF438 e a tirosinase são transcritas a partir do mesmo promotor em S. antibioticus. Bernan et al., Gene 37:101 (1985). Ambos os genes são necessários para a produção de melanina. Bernan et al., Gene 37:101 (1985). Com base em evidências genéticas, verificou-se que a proteína ORF438 funciona como uma trans-activadora da tirosinase. Lee, et al., Gene 65:71 (1988). Foi sugerido que a proteína ORF438 está implicada na secreção de tirosinase ou que pode funcionar como uma proteína semelhante a metalotioneína que fornece cobre à tirosinase, Bernan et al., Gene 37:101 (1985); Lee, et al., Gene 65:71 (1988). O local mel de S. glaucescens tem uma sequência de ORF quase idêntica a montante da tirosinase que provavelmente serve para uma função semelhante. Huber, et al. Biochemistry 24:6038 (1985); Huber, et al., Nucleic Acids Res. 15:8106 (1987). A existência de uma proteína ORF438 nunca foi, no entanto, confirmada in vivo.

Os operões da melanina de S. antibioticus e de S. glaucescens foram isolados e sequenciados e ambos partilham uma homologia de sequências e um arranjo dos genes semelhantes. A sequência polipeptídica codificada por ORF438 (146 ácidos aminados) em S. antibioticus é estrutural e funcionalmente equivalente a ORF402 (134 ácidos aminados) de S. glaucescens Huber, et al., Nucleic Acids Res. 15:8106 (1987). A quebra da sequência que codifica para ORF402 abole o fenótipo de melanina semelhante ao já conhecido para ORF438. Provas recentes sugerem que a proteína ORF438 (e por analogia a proteína ORF402 equivalente) funciona como uma protecção molecular para a tirosinase. Chen, et al., J. Biol. Chem. 268:18710 (1993).

Foi também isolada tirosinase e empregue para produzir melanina in vitro. Por exemplo, no Pedido de Patente US com o n.º de Série 7/982.095, depositado em 25 de Novembro de 1992, que se dá como aqui reproduzido por referência, os requerentes ensinam a produção de melanina in vitro utilizando uma



tirosinase que é excretada a partir do microorganismo durante a fermentação. A produção in vitro de melanina depende da produção de quantidades significativas de actividade de tirosinase. A actividade de tirosinase pode perder-se durante o isolamento da tirosinase excretada devido à quebra do complexo tirosinase - proteína activadora. É por conseguinte um objectivo da presente invenção estabilizar o complexo tirosinase - proteína activadora a fim de reduzir a perda de actividade de tirosinase durante o isolamento e a purificação.

O pedido de Patente WO-A-92/00373 refere-se a melaninas produzidas por via extracelular por microorganismos transformados.

O pedido de Patente WO-A-93/13200 refere-se a lipase fundida a um protector (limD).


Foram sintetizadas proteínas de fusão para ultrapassar a instabilidade e a degradação proteolítica de um polipeptídeo de interesse. Foram produzidas muitas proteínas eucarióticas em E. coli como proteínas de fusão com polipeptídeos de E. coli tais como beta-galactosidase. A beta-galactosidase pode ser utilizada para proteger a proteína estranha passageira da degradação em E. coli. Preparou-se somatostatina, a primeira proteína eucariótica a ser produzida em E. coli, por fusão de um gene sintético a uma sequência completa que codifica para beta-galactosidase (Itakura, et al., Science 198:1056 (1977)) e isolou-se subsequentemente a somatostatina por cisão química da proteína de fusão. Quando dois polipeptídeos que funcionam independentemente são fundidos numa única poliproteína por meio de uma fusão de um gene sintético, a construção genética resultante pode ser manipulada para expressão por detrás de um único promotor, de um sítio de ligação de um ribossoma e de um codão de início. Uma fusão genética construída deste modo pode ser colocada numa localização única no interior de um cromossoma ou de um elemento episomal para expressão subsequente da proteína de fusão. Estes genes de fusão são



inerentemente mais estáveis porque ambas as sequências genéticas são expressas de modo coordenado a níveis elevados a partir de um único promotor. Podem deste modo ser evitados efeitos indesejáveis tais como regulação diferencial para a baixa ou rearranjo e supressão de um dos genes.

Infelizmente, no entanto, a maioria das construções de proteínas de fusão não é funcional. As proteínas dobram-se em estados activos conforme a conformação que dependem da respectiva sequência primária de ácidos aminados. Sequências adicionais de polipeptídeos no terminal C ou N podem interferir com a dobragem correcta, impedindo assim a formação da proteína biologicamente activa. As enzimas tipicamente dobram-se em conformações tridimensionais bem definidas a fim de permitir a formação de uma bolsa catalítica que exclui moléculas de substrato potenciais de dimensão ou conformação anormais, mas permite acesso às moléculas de substrato com a estrutura tridimensional correcta. Muitas enzimas não funcionam como polipeptídeos de fusão porque as extensões da sequência interferem com a dobragem correcta ou interferem por bloqueamento estérico do acesso do substrato ao sítio catalítico.

A presente invenção refere-se ao reconhecimento pelos requerentes de que deve ser possível construir uma enzima de fusão biologicamente activa por acoplamento de tirosinase com uma proteína activadora. Verificou-se que os resíduos de histidina n.º 102 e n.º 117 da proteína activadora ORF438 são críticos para a ligação de cobre ao sítio activo da tirosinase. Chen, et al., J. Biol. Chem. 268:18710 (1993). A fim de formar uma enzima de fusão biologicamente activa entre a tirosinase e uma proteína activadora, os domínios funcionais devem estar correctamente dobrados tanto na tirosinase como na proteína activadora. Para além disso, a enzima de fusão deve ter capacidade de tomar uma conformação estrutural que permita que a proteína activadora ponha à disposição o cobre por via intermolecular ao sítio activo da tirosinase a fim de formar uma tirosinase biologicamente activa. Com base na técnica



anterior existente, não é claro se uma tal enzima de fusão será ou não biologicamente activa.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma tirosinase e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma proteína activadora de tirosinase. As proteínas activadoras utilizadas na presente invenção são ORF438 e ORF402. As tirosinases utilizadas na presente invenção incluem tanto tirosinases procarióticas como tirosinases eucarióticas. São preferidas tirosinases procarióticas que necessitam de uma proteína activadora separada, em particular tirosinases derivadas de Streptomyces. É também preferível que a sequência da proteína activadora esteja posicionada a 5' em relação à sequência de tirosinase.

A presente invenção também se refere a um vector útil para a introdução de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão num organismo não humano. O vector compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão da presente invenção e uma sequência promotora que regula a transcrição da enzima de fusão. A presente invenção também se refere a organismos não humanos, tais como bactérias, fungos e leveduras, plantas e animais que tenham sido transformados pelo vector da presente invenção.

A presente invenção também se refere a uma enzima de fusão que compreende uma sequência de ácidos aminados para a tirosinase e uma sequência de ácidos aminados para uma proteína activadora de tirosinase. A proteína de fusão pode também conter um adaptador posicionado entre as sequências de ácidos aminados da proteína activadora e da tirosinase.

A presente invenção também diz respeito à produção de



melanina. A melanina pode ser produzida *in vitro* fazendo contactar uma enzima de fusão com um substrato enzimático sob condições de reacção adequadas para formar a melanina. A melanina pode também ser produzida in vivo por um organismo transformado por um vector da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 representa a biossíntese passo a passo de melaninas.

A Figura 2 apresenta o mapa plasmídico de pBGC623.

A Figura 3 apresenta o mapa plasmídico de pBGC635.

A Figura 4 apresenta o mapa plasmídico de pBGC636.

A Figura 5 apresenta o mapa plasmídico de pBGC646.

A Figura 6 apresenta o mapa plasmídico de pBGC648.

A Figura 7 apresenta uma comparação das capacidades de E. coli para a produção de melanina quando transformado pelos plasmídeos pBGC623, pBGC635, pBGC636, pBGC646 e pBGC648.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de tirosinase e de uma proteína activadora de tirosinase. A presente invenção também se refere a um vector útil para a transformação de um organismo hospedeiro não humano que contém a sequência de ácidos nucleicos da presente invenção.

A presente invenção também se refere à expressão de uma enzima de fusão de uma tirosinase e de uma proteína activadora pelo organismo transformado. Organismos hospedeiros não humanos



que podem ser transformados de modo a expressarem a enzima de fusão da presente invenção incluem mas não são limitados a bactérias, fungos e leveduras, plantas e animais. A expressão da enzima de fusão pelo organismo hospedeiro não humano permite e/ou intensifica a actividade de tirosinase no hospedeiro, permitindo e/ou intensificando deste modo a produção de melanina pelo hospedeiro.

A presente invenção também se refere a uma enzima de fusão que compreende uma sequência de ácidos aminados para a tirosinase e uma sequência de ácidos aminados para uma proteína activadora de tirosinase.

Finalmente, a presente invenção refere-se à produção in vivo e in vitro de melanina utilizando a enzima de fusão da presente invenção.

A enzima de fusão da presente invenção compreende uma sequência de ácidos aminados para a tirosinase e uma sequência de ácidos aminados para uma proteína activadora. As sequências de ácidos nucleicos para as duas proteínas estão sob o controlo do mesmo promotor e são expressas portanto sob a forma de um único peptídeo.

As tirosinases utilizadas na presente invenção incluem tanto tirosinases procarióticas como tirosinases eucarióticas. Em alguns organismos, as tirosinases são designadas por oxidases de polifenol. São preferidas as tirosinases de procariontes, em particular as tirosinases que necessitam de uma proteína activadora separada tal como as que foram obtidas a partir de Streptomyces.

As proteínas activadoras utilizadas na presente invenção são ORF438 e ORF402.

A proteína activadora empregue na presente invenção não necessita de ser de ocorrência natural no organismo de que a



tirosinase é derivada. Pelo contrário, as proteínas activadoras de diferentes origens devem funcionar com uma determinada tirosinase tendo em vista a semelhança dos sítios de ligação de cobre de diferentes tirosinases. Ver Chen et al., J. Biol. Chem. 268 18710 (1993).

As enzimas de fusão da presente invenção são de preferência construídas de tal modo que a sequência de ácidos aminados para a proteína activadora está posicionada no terminal N da sequência de ácidos aminados da tirosinase. Conforme se pode verificar a partir do Exemplo 5, as enzimas de fusão em que a proteína activadora está posicionada no terminal N da tirosinase apresentam capacidades de produção de melanina equivalentes como se a tirosinase e a proteína activadora fossem expressas separadamente.

As tirosinases eucarióticas tendem a compreender cadeias polipeptídicas simples de elevado peso molecular (50 a 70 kD) sem proteínas activadoras definidas. Os requerentes especulam que o equivalente activador da proteína ORF438 está incluído no interior da coluna vertebral polipeptídica das tirosinases eucarióticas. Com base na homologia de ácidos aminados nos sítios activos entre tirosinases eucarióticas e de Streptomyces, parece que ocorrem sequências polipeptídicas em excesso na região terminal C das maiores enzimas eucarióticas. Com base nesta observação, pode prever-se que a ORF438 funcionaria melhor se fundida no terminal C em vez do terminal N da tirosinase de Streptomyces de 30 kD, uma vez que a proteína de fusão imitaria então as tirosinases eucarióticas no que se refere à localização do sítio catalítico. No entanto, uma vez que muitos polipeptídeos sintetizados de novo sofrem a sua dobragem tridimensional na sua conformação activa preferida com início no terminal C livre, pode-se também esperar que as adições ao terminal C impeçam a dobragem correcta e, por conseguinte, a actividade catalítica normal. Como consequência, antes da preparação das enzimas de fusão da presente invenção, não era claro se uma enzima de fusão seria funcional no



terminal N ou no terminal C.

A sequência de ácidos aminados que codifica para a proteína activadora não necessita de estar directamente ligada à sequência de tirosinase. No plasmídeo pBGC648, foi inserido um resíduo His entre a proteína activadora e a sequência de tirosinase. Como sequências de ligação entre a tirosinase e a proteína activadora, é preferível utilizar um único ácido aminado ou uma sequência de repetição de ácidos aminados Pro-Thr, que se comporta como uma charneira natural.

A determinação de uma ampla variedade de sequências de ácidos aminados que podem ser interpostas entre as sequências da tirosinase e da proteína activadora pode ser efectuada de modo rotineiro por um especialista na técnica tendo em conta os ensinamentos da presente invenção.

Outros adaptadores polipeptídicos que são conhecidos da literatura como proporcionando um elevado grau de flexibilidade entre dois sub-domínios polipeptídicos poderão igualmente trabalhar como sequências de ligação entre a sequência da tirosinase e a sequência da proteína activadora. Um exemplo deste tipo de polipeptídeo charneira é uma unidade de repetição prolina - treonina tal como as formas conhecidas de proteínas de ligação de celulose. Ong, et al., Bio/Technology 7 604 (1989). A construção de adaptadores oligonucleotídicos sintéticos que codificam para polipeptídeos charneira de flexibilidade conhecida está abrangida pelo nível de conhecimento normal. Para além disso, é possível utilizar adaptadores oligonucleotídicos sintéticos para construir sequências adaptadoras polipeptídicas aleatórias a fim de ligar em conjunto os domínios tirosinase - proteína activadora. Pode-se prever que os adaptadores com um elevado grau de flexibilidade e comprimento suficiente trabalhem melhor para a cis-activação intermolecular de tirosinase. Será de prever que polipeptídeos adaptadores inflexíveis ou polipeptídeos adaptadores extremamente curtos permitam apenas a trans-



-activação intramolecular de enzimas de fusão adjacentes.

A fim de proporcionar uma compreensão clara e consistente da descrição e das reivindicações, incluindo o âmbito dado pelos termos referidos, apresentam-se as seguintes definições:

Proteína activadora: Um produto genético que altera, activa ou intensifica a actividade de tirosinase. A proteína activadora pode funcionar como um trans-activador, como uma proteína semelhante a uma metalotioneína que liberta um ião a uma apoenzima de tirosinase ou pode funcionar auxiliando a secreção de tirosinase. O gene ORF438, ORF402 e ORF(s) a 3' em relação à sequência que codifica para a tirosinase codificam para proteínas activadoras que intensificam a melanogénese de todos os modos descritos.

Melanina: As melaninas são polímeros produzidos por polimerização de intermediários reactivos. Os mecanismos de polimerização incluem mas não são limitados a auto-oxidação, oxidação catalisada e polimerização iniciada por radicais livres. Os intermediários reactivos são produzidos por via química ou por via enzimática a partir de precursores. Enzimas adequadas incluem, mas não se limitam a peroxidases e catalases, oxidases de polifenol, tirosinases, hidroxilases de tirosina ou lacases. Os precursores que são convertidos nos intermediários reactivos são compostos aromáticos hidroxilados. Os compostos aromáticos hidroxilados adequados incluem, mas não são limitados a 1) fenóis, polifenóis, aminofenóis e tiofenóis de hidrocarbonetos aromáticos ou policíclicos, incluindo, mas não se limitando a fenol, tirosina, pirogalhol, 3-aminotirosina, tiofenol e a-naftol; 2) fenóis, polifenóis, aminofenóis e tiofenóis de hidrocarbonetos heterocíclicos ou heteropolicíclicos, tais como, mas não se limitando a 2-hidroxi-pirrólo, 4-hidroxi-1,2-pirazolo, 4-hidroxi-piridina, 8-hidroxi-quinolina e



4,5-di-hidroxibenzotiazolo. Compostos aromáticos hidroxilados adequados também incluem X/L-tirosina, L-tirosina/X e X/L-tirosina/X, em que X é um único ácido aminado, um dipeptídeo ou um oligopeptídeo ligado a L-tirosina.

As sequências de ácidos nucleicos que codificam para as enzimas de fusão da presente invenção podem ser inseridas numa ampla variedade de construções vectoriais conhecidas da especialidade para a transformação de um organismo hospedeiro não humano. Entre as técnicas adequadas incluem-se as descritas em Maniatis et al., Molecular Cloning, 1.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1982); Molecular Cloning, 2.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1989); Methods in Enzymology, vols. 68 (1979), 100 (1983), 101 (1983), 118 (1986) e vols. 152-154 (1987) DNA Cloning, Glover, Ed., IRL Press, Oxford (1985); e Plant Molecular Biology: Manual, Gelvin et al., eds., Kluwer Academic Publishers, Podrecht (1988). Foram descritas composições de meios em Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1972), bem como nas referências anteriormente identificadas. Hopewood et al., "Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual", The Jones Innes Foundation, Norwich, Inglaterra (1985).

No que se refere à expressão da enzima de fusão tirosinase - proteína activadora da presente invenção num microorganismo transformado, é preferível que o organismo transformado seja cultivado sob as condições descritas no Pedido de Patente US com o n.º de Série 857.602, depositado em 30 de Março de 1992.

No que se refere à expressão da enzima de fusão tirosinase - proteína activadora da presente invenção em plantas, é preferível que o bloco integrado de ácidos nucleicos que codifica para a enzima de fusão seja inserido numa das construções virais descritas no Pedido de Patente US com o n.º de Série 923.692, depositado em 31 de Julho de 1992 ou no



Pedido de Patente US com o n.º de Série 997.733, depositado em 30 de Dezembro de 1992

Os vectores que codificam para a enzima de fusão tirosinase - proteína activadora da presente invenção podem ser produzidos por técnicas normais. Os vectores apropriados que podem ser utilizados como materiais de partida são conhecidos da especialidade.

A sequência de ADN que codifica para a enzima de fusão é inserida num vector apropriado de tal modo que a enzima é correctamente expressa. Por outras palavras, a sequência de ADN é posicionada na orientação correcta e no quadro de leitura apropriado de tal modo que se produz a sequência de ácidos aminados correcta por expressão da sequência de ADN no hospedeiro. De acordo com técnicas convencionais, é em geral construída uma sequência de ADN quimérica que contém um promotor operável no hospedeiro específico e a sequência de ADN que codifica para a enzima pretendida. A sequência de ADN quimérica pode ainda conter a 3' sequências não codificadoras operáveis no hospedeiro. A sequência de ADN quimérica pode ser preparada in situ no interior de um vector adequado por inserção da sequência de ADN que codifica para a enzima num sítio de restrição de um vector de transformação do hospedeiro conhecido. Em alternativa, o gene quimérico poderia ser em primeiro lugar construído e em seguida inserido num vector a fim de produzir um vector de transformação. O vector pode ser adicionalmente modificado por utilização de uma sequência de intensificação e/ou de um promotor forte, o que provoca uma produção aumentada da enzima de fusão.

O vector típico é um plasmídeo que possui um ou mais genes marcadores para resistência a antibióticos, uma origem de replicação e vários sítios de restrição úteis para clonagem ou subclonagem de fragmentos de restrição. Foram descritos numerosos vectores úteis para a transformação de muitos microorganismos, incluindo mas não se limitando a Streptomyces e E.



coli. Ver, por exemplo, Cloning Vectors, Pouwels et al., ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdão (1985).

Foram descritos numerosos plasmídeos que ocorrem naturalmente em Streptomyces, muitos dos quais apresentam proficiência conjugal. Dois destes plasmídeos isolados, SPL1.2 e pIJ101, formaram a base de uma série de vectores plasmídicos úteis. Thompson et al., Gene 20:51 (1982). Os plasmídeos da família de SPL1, da qual SPL1.2 é o membro detectado maior, foram descobertos como replicões autónomos em S. lividans 66 após emparelhamento interespecífico com S. coelicolor A3(2). O replicão SPL1 é integrado no genoma de S. coelicolor, mas pode ser retirado em conjunto com vários comprimentos de ADN da vizinhança de modo a tornar-se autónomo em S. lividans. Os plasmídeos SPL1 existem de forma estável com um número de cópias de 4 a 5 por cromossoma em S. lividans e possuem uma estreita variedade de hospedeiros.

O plasmídeo pIJ101 de 8,9 kb foi descoberto em S. lividans ISP5434 (Kieser et al., Mol. Gen. Genet. 185:223 (1982)), mas pode ser transferido por conjugação para uma ampla variedade de espécies de Streptomyces. Têm sido isolados derivados (p. ex. pIJ102) a partir do plasmídeo que possuem propriedades semelhantes mas são menores. Kieser et al., (1982) supra. O plasmídeo pIJ101 tem um número de cópias de 100 a 300 por cromossoma equivalente na maioria dos hospedeiros e um replicão mínimo de menos de 2,1 kb. Foram construídos derivados que apresentam determinantes de resistência a fármacos a fim de actuarem como vectores e encontra-se disponível um plasmídeo quimérico que pode ser utilizado como vector lançadeira entre E. coli e Streptomyces.

O fago temperado øC31 possui uma ampla gama de hospedeiros entre os Streptomyces e causa a lise de S. coelicolor A-3(2) por meio de um acontecimento de integração específica em relação a um sítio. Lomovshaya et al., Bacteriol. Rev. 44, 206 (1980). Podem ser empacotados até 42,4 kb de ADN no interior de



uma partícula fágica viável, mas apenas 32 kb (no máximo) do ADN contém a informação genética essencial para a formação de placas. Os derivados de øC31 que contêm supressões podem ser utilizados como vectores e podem fazer-se crescer fagos recombinantes liticamente ou podem ser utilizados para provocar a lise de estirpes de Streptomyces adequadas.

Os plasmídeos derivados de pBR322 são muito comuns para utilização na transformação de E. coli. Estes plasmídeos possuem um par de genes de resistência a antibióticos que conferem resistência a antibióticos quando o Escherichia coli é transformado com êxito. De modo típico, a inserção de um segmento de ADN é feita de tal modo que um dos genes de resistência a antibióticos é inactivado. A selecção é então efectuada por selecção de E. coli que apresente uma resistência ao antibiótico conferida pelo segundo gene. Bolivar et al., Gene 2:95 (1977); e Sutcliff, J., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75:3737 (1978).

Outro exemplo de vectores de transformação é o bacteriófago. A série M13 é constituída por bacteriófagos de E. coli filamentosos modificados que contêm ADN de cadeia simples. A série M13 contém o gene lacZ para a β -galactosidase e metaboliza o análogo Xgal da galactose produzindo uma coloração azul. Quando se coloca uma inserção clonada na sequência do poliadaptador localizada no terminal amina do gene lacZ, inactiva-se o gene. Os microorganismos que contêm um M13 com um lacZ inactivado (representando uma inserção clonada) podem ser distinguidos dos que contêm um M13 com um gene lacZ activo por meio da ausência de coloração azul. Messing et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3642 (1977); e Messing, Methods in Enzymology 101:20 (1983).

Outros vectores de transformação pertencem à série pUC de plasmídeos. Estes contêm o gene de resistência à ampicilina e a origem de replicação de pBR322 e uma porção do gene lacZ de E. coli. A região lac contém uma sequência de um poliadaptador de



sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição idênticos ao da série M13. A série pUC tem a vantagem de que pode ser amplificada por cloranfenicol. Quando se faz a clonagem de um fragmento de ADN na região lac, o gene lac é inactivado. Quando se cultiva E. coli que contém um plasmídeo pUC com um gene lacZ inactivado na presença de isopropiltio-galactósido (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido (Xgal), as respectivas colónias são brancas. Se o microorganismo da cultura contém um plasmídeo pUC com um gene lacZ activo, as respectivas colónias são azuis. Vieira et al., Gene 19:259(1982). As bactérias são transformadas por meios convencionais da especialidade.

O género Streptomyces é um de três géneros aeróbicos de bactérias da ordem dos Actinomycetales. Os Streptomyces são bactérias Gram-positivss, possuem micélio e formam esporos. Foram descritos vários plasmídeos de Streptomyces de ocorrência natural. O Streptomyces lividans TK64 não tem um gene de tirosinase e não produz melanina. Os requerentes descrevem a transformação de Streptomyces lividans TK64 com o plasmídeo pIJ702 que codifica para um gene de tirosinase no Pedido de Patente US com o n.º de Série 7/857.602, depositado em 30 de Março de 1992. A transformação é levada a efeito por meios normais da especialidade. De modo semelhante, a transformação de Streptomyces pode ser efectuada utilizando um plasmídeo que codifica para a enzima de fusão da presente invenção. Os vectores de transformação da presente invenção podem também ser utilizados para transformar vários microorganismos após inserção em vectores que são úteis para a transformação do microorganismo hospedeiro correspondente.

O plasmídeo Bluescript (fornecido por Stratagene, La Jolla, CA) é um derivado de pUC que possui um indicador colorido de β -galactosidase e um promotor de lac. No Pedido de Patente US com o n.º de Série 7/857.602, os requerentes descrevem a modificação do plasmídeo Bluescript por inserção de um gene de tirosinase. Este plasmídeo modificado foi utilizado



para transformar com êxito E. coli que formou colônias pigmentadas. De modo semelhante, o plasmídeo Bluescript pode ser modificado por inserção de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para a enzima de fusão da presente invenção.

A melanina foi purificada a partir de células bacterianas com NaOH 0,5 N à temperatura ambiente e a 100 °C. Verificou-se que as frações pigmentadas eram: (1) solúveis em ácido e em base; (2) solúveis em álcool etílico e em base; e (3) solúveis em base apenas. Pavlenko et al., Microbiology USSR 50 539 (1981).

É possível extrair melanina solúvel a partir do meio e purificá-la. Esta operação é efectuada removendo em primeiro lugar as células e a matéria em partículas utilizando, por exemplo, filtração ou centrifugação. São conhecidos da técnica vários métodos de filtração, incluindo filtração através de lâ de vidro. Se se utiliza a centrifugação, é normalmente suficiente 5.000 X gravidade. A melanina é em seguida precipitada a um pH entre 2 e 4, de preferência de cerca de 3. A melanina precipitada é removida por filtração ou por centrifugação. A melanina é lavada por ressolubilização sucessiva a pH elevado, isto é, a um pH de cerca de 7,0 até cerca de 9,0, de preferência a um pH de cerca de 8,0 e precipitação a pH baixo seguida de filtração ou de centrifugação. A melanina pode também ser concentrada utilizando filtração de peso molecular, tal como osmose inversa. A precipitação por sal pode ser eficaz para a precipitação da melanina a pH baixo.

A invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos não limitativos.



EXEMPLOS

1. Preparação dos plasmídeos pBGC623, pBGC635 e pBGC636

O plasmídeo pBGC623 é um plasmídeo que contém a sequência de ácidos nucleicos para ORF438. A Figura 2 proporciona o mapa plasmídico de pBGC623. O plasmídeo pBGC635 é um plasmídeo que contém uma sequência de ácidos nucleicos para a tirosinase. A Figura 3 proporciona o mapa plasmídico de pBGC635. O plasmídeo pBGC636 é um plasmídeo que codifica tanto para ORF438 como para a tirosinase sob promotores separados. A Figura 4 proporciona o mapa plasmídico de pBGC636. A preparação dos plasmídeos pBGC623, pBGC635 e pBGC636 é descrita no Pedido de Patente US com o n.º de Série 7/857.602.

2. Preparação de pBGC646

A fim de preparar pBGC646, alinharam-se as extremidades do sítio Bcl I no codão de paragem do gene da tirosinase (em pBGC188Nde) com nuclease de feijão de mungo e ligou-se com um adaptador sintético Eco RI (dGGAATTCC; SEQ. NO. 1). O gene da tirosinase foi removido do plasmídeo pBGC188Nde sob a forma de um fragmento Nde I/Eco RI de 822 pb e foi purificado em gel de agarose de baixa temperatura de fusão. O fragmento purificado foi ligado num plasmídeo que continha ORF438 (pBGC623) que foi modificado como se segue. O plasmídeo pBGC623 foi cindido com Nco I, as extremidades foram alinhadas com nuclease de feijão de mungo e foi ligado com um adaptador sintético Eco RI (dGGAATTCC). O plasmídeo foi purificado em gel de agarose de baixa temperatura de fusão e foi ligado com o fragmento Nde I/Eco RI que continha o gene de tirosinase modificado. A Figura 5 proporciona o mapa plasmídico de pBGC646 [SEQ. NO. 2]. A sequência de ácidos aminados traduzida para a enzima de fusão codificada pelo plasmídeo pBGC646 é apresentada como SEQ. NO. 3.

Escrutinaram-se os transformantes em HB101 e



identificaram-se dois transformantes independentes por terem a orientação correcta. Estes plasmídeos são pBS646.9 e pBS646.19 e são ambos idênticos. Os dois plasmídeos foram utilizados para transformar a estirpe de *E. coli* K38 que contém o plasmídeo pGP1-2 e depositou-se em agar-agar que continha tirosina e cobre. Ambos os transformantes deram um fenótipo de melanina conforme descrito anteriormente (della, Cioppa et al. Bio/Technology 8:634-638 (1990)) e verificou-se por SDS-PAGE que dava origem a uma banda de ~45 kD por SDS-PAGE. Prevê-se que a enzima de fusão híbrida tirosinase/ORF438 codifica para uma proteína com um PM de 45.806 com quatro ácidos aminados adicionais que se ligam a dois domínios funcionais (NH₂-tirosinase-trp-asn-ser-ala-ORF438-COOH).

3. Preparação de pBGC648

A fim de construir um segundo gene de fusão híbrido entre ORF438 e tirosinase, recozeram-se os dois oligonucleótidos sintéticos apresentados em seguida

5'-dCCAGGGCGCC CGGCTCCTCC CCTTCCCCTCCAACCA-3' [SEQ. NO. 4]

3'-dTCGAGGTCCCGCGGGCCGAGGAGGGGAAGGGGAGGTTGGTAT-5' [SEQ. NO. 5],

trataram-se com quinase e utilizaram-se para clonar no sítio Sac I do gene ORF438. Esta sequência oligonucleotídica de substituição tem como resultado a destruição do codão de paragem TGA de ORF438 e cria um sítio NdeI interior ao quadro no seu lugar para inserção de tirosinase. Estabeleceu-se uma reacção de ligação tripla que incluía o oligonucleótido recozido apresentado acima, uma forma de fragmento Hind III/Sac I de 2.934 pb pBGC623 e um fragmento NdeI/Hind III de 1.107 pb de pBGC635. O novo plasmídeo (pBGC648) cria uma fusão de genes ORF438/tirosinase no interior do quadro que codifica para uma cadeia polipeptídica simples de 46.230 daltons. A introdução do novo sítio NdeI introduz um resíduo simples de histidina entre duas sequências de codificação após tradução. A Figura 6 apresenta o mapa plasmídico de pBGC648. A sequência de ácidos nucleicos para pBGC648 é apresentada como SEQ. NO. 6. A



sequência de ácidos aminados traduzida para a enzima de fusão codificada pelo plasmídeo pBGC648 é apresentada como SEQ. NO. 7.

O ADN na junção dos genes de ORF438 e da tirosinase no plasmídeo pBGC648 foi sequenciado. Verificou-se que aproximadamente 180 pb a 3' do sítio Sac I na fusão estavam correctos e que a sequência traduzida de ácidos aminados é a prevista (Ver SEQ. No. 7).

O plasmídeo pBGC648 foi utilizado para transformar a estirpe de *E. coli* K38 que contém o plasmídeo pGP1-2 e depositou-se em agar-agar que continha tirosina e cobre. Os transformantes deram um fenótipo de melanina negro conforma descrito anteriormente (della-Cioppa et al., Bio/Technology 8:634-638 (1990)) e verificou-se por SDS-PAGE que davam origem a uma banda de ~46 kD por SDS-PAGE. Os transformantes que contém pBGC648 dão origem do fenótipo negro de melanina tão rapidamente como se verificou quando ORF438 e tirosinase são expressos sob a forma de cadeias polipeptídicas simples a partir de genes simples. Sob o aspecto fenotípico, a fusão de genes ORF438/tirosinase conserva uma actividade catalítica plena semelhante à da haloenzima de tirosinase de ~30 kD de tipo selvagem.

4. Transformação de *E. coli* com pBGC623, pBCG635 e pBCG636, pBGC646 e pBGC648

Introduziram-se os plasmídeos pBGC623, pBCG635 e pBCG636, pBGC646 e pBGC648 em *E. coli* por pré-tratamento de culturas em crescimento exponencial de *E. coli* com CaCl₂ conforme descrito por Maniatis, et al., Molecular Cloning (1982).



5. Comparação da Produção de Melanina por E. coli transformado com pBGC623, pBCG635 e pBCG636, pBGC646 e pBGC648

Os plasmídeos pBGC623, pBCG635 e pBCG636, pBGC646 e pBGC648 foram introduzidos cada um em E. coli. As estirpes de E. coli transformadas foram em seguida cultivadas em placas de agar-agar que continham tirosina e cobre, conforme descrito anteriormente em della-Cioppa et al., Bio/Technology 8 634 (1990) a fim de avaliar a capacidade de cada estirpe para a produção de melanina. A Figura 7 apresenta uma comparação das capacidades de produção de melanina de E. coli quando transformado por estes diferentes plasmídeos.

A quantidade de melanina formada foi determinada pela dimensão e pela intensidade de coloração dos halos negros de melanina que se formaram ao redor das colónias de E. coli transformado. A velocidade de desenvolvimento de coloração em placas de agar-agar e a intensidade da formação do halo negro são directamente proporcionais ao nível da actividade enzimática de tirosinase de cada uma das colónias de E. coli que contêm os diferentes plasmídeos. A formação de melanina foi quantificada como (-) nenhuma, (+) muito fraca, (++) fraca, (+++) moderada, (++++) forte e (+++++) muito forte.

E. coli transformado com pBGC623 ou com pBGC635 não produz um fenótipo positivo de melanina negra. E. coli transformado com pBGC636 produziu um fenótipo positivo de melanina negra.

E. coli transformado com pBGC646 deu origem a um fenótipo positivo de melanina negra. No entanto, E. coli transformado com pBGC646 produziu melanina a uma velocidade inferior a E. coli transformado com pBGC636 em que ORF438 e tirosinase são expressos sob a forma de cadeias polipeptídicas simples a partir de genes simples.

E. coli transformado com pBGC648 produziu um fenótipo



positivo de melanina negra a uma velocidade comparável a pBGC636, indicando que a enzima de fusão produzida por pBGC648 funciona tão bem como quando ORF438 e tirosinase são expressos independentemente.

6. Expressão da enzima de fusão tirosinase/ORF438 que contém uma sequência de direccionamento a cloroplastos em plantas

Para a expressão de uma enzima de fusão tirosinase - proteína activadora em plantas superiores, pode ser vantajoso direccionar a enzima de fusão para o cloroplasto. Sabe-se que os cloroplastos contêm a via enzimática para a produção de L-tirosina (o substrato primário para a tirosinase), e que o ambiente oxidativo no interior dos cloroplastos pode ser o adequado para alcançar uma actividade enzimática óptima.

A fim de direccionar um enzima de fusão tirosinase - proteína activadora para os cloroplastos, clonou-se a sequência nucleotídica que codifica para o peptídeo de trânsito de cloroplastos (*chloroplast transit peptide* = CPT) da subunidade menor da carboxilase de bisfosfato de ribose (RuBPCase SSU) de Nicotiana tabacum (sob a forma de um fragmento Nco I/Sph I) e fundiu-se por meio do seu sítio Sph I de ocorrência natural (no sítio de clivagem cys-met do CPT) no sítio Sph I de ocorrência natural no terminal N de ORF438. O nucleótido de fusão CTP/ORF438 foi em seguida permutado sob a forma de um fragmento Nco I/Sac I no plasmídeo Bluescript™ que continha a sequência de ORF438/tirosinase conforme descrito em relação com o plasmídeo pBS648. A sequência de nucleótidos resultante e a sequência de ácidos aminados traduzida da fusão CTP/ORF438/-tirosinase são apresentadas em SEQ. No. 8 e SEQ. No. 9, respectivamente. O gene de fusão CTP/ORF438 tirosinase codifica para 478 resíduos de ácidos aminados dos quais os 57 no terminal N dirigem a fusão ORF438/tirosinase para o cloroplasto. Após importação no compartimento do cloroplasto, o CTP de 57 ácidos aminados é removido por via proteolítica,



resultando deste modo a enzima de fusão ORF438/tirosinase de ~45 kD idêntica à anteriormente produzida em E. coli. A enzima de fusão CTP/ORF438/tirosinase tem um peso molecular deduzido de 51.461 daltons.

A sequência de nucleótidos de CTP/ORF438/tirosinase pode então ser inserida numa construção viral tal como as descritas no Pedido de Patente US com o n.º de Série 923.692, depositado em 31 de Julho de 1992, ou o pedido de Patente US com o n.º de Série 997.733, depositado em 30 de Dezembro de 1992, e pode ser utilizada para infectar por via sistémica plantas superiores.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: Della-Cioppa, Guy
Kumagai, Monto
- (ii) EPÍGRAFE DA INVENÇÃO: ENZIMA DE FUSÃO TIROSINASE-PROTEÍNA
ACTIVADORA
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 9
- (iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 - (A) ENTIDADE: Pennie & Edmonds
 - (B) RUA: 2730 Sand Hill Road
 - (C) CIDADE: Menlo Park
 - (D) ESTADO: Califórnia (E) PAÍS: E.U.A.
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94025
- (v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:
 - (A) TIPO DE MEIO: Disco flexível
 - (B) COMPUTADOR: Compatível IBM PC
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMA: Patent in Edição #1.0,
Versão #1.25
- (vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
 - (A) PEDIDO NÚMERO: US 08/152,483
 - (B) DATA DO REQUERIMENTO: 12 de Novembro de 1993
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) PEDIDO NÚMERO: 7/857.602
 - (B) DATA DO REQUERIMENTO: 30 de Março de 1992
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) PEDIDO NÚMERO: 923.692
 - (B) DATA DO REQUERIMENTO: 31 de Julho de 1992
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) PEDIDO NÚMERO: 600.244
 - (B) DATA DO REQUERIMENTO: 22 de Outubro de 1990
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) PEDIDO NÚMERO: 641.617
 - (B) DATA DO REQUERIMENTO: 16 de Janeiro de 1991
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) PEDIDO NÚMERO: 737.899
 - (B) DATA DO REQUERIMENTO: 26 de Julho de 1991
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE O ADVOGADO/AGENTE:
 - (A) NOME: Halluin, Albert P.
 - (B) NÚMERO DE REGISTO: 25.227
 - (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: BIOG-20240/8129-040
- (ix) INFORMAÇÃO DE TELECOMUNICAÇÕES:
 - (A) TELEFONE: (415) 854-3660
 - (B) TELEFAX: (415) 854-3694
 - (C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 8



- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
 - (A) DESCRIÇÃO: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vi) ORIGEM PRIMITIVA:
 - (A) ORGANISMO:
- (vii) ORIGEM IMEDIATA:
 - (B) CLONE
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

GGAATTC

8

- (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 4294
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
 - (A) DESCRIÇÃO: ADN
 - (iii) HIPOTÉTICO: NÃO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
 - (vi) ORIGEM PRIMITIVA:
 - (A) ORGANISMO:
 - (vii) ORIGEM IMEDIATA:
 - (B) CLONE:
 - (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT60
GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC120
GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC180
GAGACCCACG CTGACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG240
AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTGCCCCGG300
AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCCCAA CCTTCTTGCC ATTGCTACAG360
GCATCGTGGT GTCACGCTCG GCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT420
CAAGCGGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC480
CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGCS40
ATAATCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA600
CCAAGTATTT GGAAGATCCG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAACA CGGGATAATA660



CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA720
AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA780
ACTGATCTTC AGCATCTTIT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC840
AAAAAGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC900
TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG960
AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC1020
CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACTA TAAAAATAGG CGTATCACGA1080
GGCCCTTTCG TCTTCAAGAA ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat1140
gaccaaatac ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat1200
caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc aaacaaaaaa1260
accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaal320
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaactactgtc cttctagtgt agccgtagtt1380
agccaccac tcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt1440
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgatal500
gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt1560
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac1620
gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggagal680
gcgacagagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg1740
ccacctctga cttgagcgtc gatttttctg atgctcgtca gggggcgga gcctatggaal800
aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat1860
gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc1920
tgataaccgt cgccgcagcc gaacgaccga gcgagcagag tcagtgagcg aggaagcggal980
agagcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcaCAGA2040
TCTGtggtgc actctcagta caatctgtc tgatgccga tagttaagcc agtatacact2100
ccgctatcgc tacgtgactg ggtcatggct ggcccccgac acccgccaac acccgctgac2160
gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc2220
gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gCCcagctgC2280
GATTCGAAct tctcgattcg aacttctgat agacttcgaa attaatacga ctactatag2340
ggagaccaca acggtttccc tctagaaata atttgttta actttaagaa ggagatatac2400
atatgACCGT CCGCAAGAAC CAGGCGTCCC TGACCGCCGA GGAGAAGCGC CGCTTCGTGC2460
CCGCCCTGCT CGAACTCAAG CGCACCGGCC GCTACGACGC CTTTCGTACC ACGCACAACG2520
CGTTCATCCT GGGCGACACC GACAACGGCG AGCGCACCGG CCACCGTTCG CCGTCCTTCC2580
TGCCCTGGCA CCGCAGATTT CTGCTGGAGT TCGAGCGGGC GCTCCAGTCG GTGGACGCGT2640
CGGTGGCGCT GCCGTACTGG GACTGGTCCG CCGACCGGTC CACCCGGTCC TCGCTGTGGG2700
CGCCGGACTT CCTCGGCGGC ACCGGGCGCA GCCGGGACGG CCAGGTGATG GACGGGCCGT2760
TCGCCCGGTC GGCCGGCAAC TGGCCGATCA ATGTGCGGGT GGACGGCCGT ACGTTCCTGC2820
GGCGGGCGCT CGGCGCGGGC GTGAGCGAAC TGCCACGCG TGCCGAGGTC GACTCGGTGC2880
TGCGGATGGC GACGTACGAC ATGGCGCCCT GGAACAGCGG CTCCGACGGC TTCGCAACC2940
ATCTCGAAGG GTGGCGCGGG GTCAATCTGC ACAACCGGGT GCATGTCTGG GTCGGCGGCC3000

AGATGGCGAC CGGGGTCTCC CCCAACGACC CGGTGTTCTG GCTGCACCAC GCCTACATCG3060
ACAAGCTGTG CCCCCAGTGG CAGCGCCGGC ACCCCTCGTC CCGGTATCTG CCGGGCGGG3120
GCACGCCGAA CGTCGTCGAC CTCAACGAGA CGATGAAGCC GTGGAACGAC ACCACCCCG3180
CGGCCCTGCT GGACCACACC CGGCACTACA CCTTCGACGT Ctggaattcc GCGGAACTCA3240
CCCGTCGTCG CGCGCTCGGC GCCGCAGCCG TCGTCGCCCG CGGTGTCCCG CTGGTCGCCC3300
TTCCCGCCCG CCGCGCGGAC GATCGGGGGC ACCACACCCC CGAGGTCCCC GGAACCCCG3360
CCCGTCCGG CGCCCCCGCC GCCTTCGACG AGATCTACAA GGGCCGCCG ATACAGGGCC3420
GGACGGTCAC CGACGGCGGG GGCCACCACG GCGGCGGTCA CGGCGGTGAC GGTCACGGCG3480
GCGGCCATCA CGGCGCGGGT TACGCCGTGT TCGTGGACGG CGTCGAACTG CATGTGATGC3540
GCAACGCCGA CGGCTCGTGG ATCAGCGTCG TCAGCCACTA CGAGCCGGTG GACACCCCG3600
GCGCCGCGGC CCGCGCTGCG GTCGACGAGC TCCAGGGCGC CCGGCTCCTC CCCTTCCCCT3660
CCAActgaCC TTCTCCCCCG CACTTTTGA GCACCCGCAC atgACCGTCC GCAAGAACCA3720
GGGTCCCTG ACCGCCGAGG AGAAGCGCCG CTTGTCGCC GCCCTGCTCG AACTCAAGCG3780
CACCGGCCG TACGACGCCT TCGTCACCAC GCACAACGG TTCATCCTGG GCGACACCGA3840
CAACGGCGAG CGCACCGGCC ACCGTTCCGCC GTCCTTCTG CCCTGGCACC GCAGATTTCT3900
GCTGGAGTTC GAGCGGGCGC TCCAGTCGGT GGACGCGTCG GTGGCGCTGC CGTACTGGGA3960
CTGGTCCGCC GACCGGTCCA CCCGGTCTC GCTGTGGGCG CCGGACTTCC TCGGCGGCAC4020
CGGGCGCAGC CGGGACGGCC AGGTGATGGA CGGGCCGTTG GCCGCGTCGG CCGGCAACTG4080
GCCGATCAAT GTGCGGGTGG ACGGCCGTAC GTTCTGCGG CGGGCGCTCG GCGCGGGCGT4140
GAGCGAACTG CCCACGCGTG CCGAGgtcga cTCAACGAG ACGATGAAGC CGTGGAACTG4200
CACCACCCG GCGGCCTGC TGGACCACAC CCGGCACTAC ACCTTCGACG TctgaTCcaa4260
gcttATCGAT GATAAGCTGT CAAACATGAG AATT 4294

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 422
 - (B) TIPO: ácidos aminados
 - (C) CADEIA:
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
 - (A) DESCRIÇÃO: proteína
- (iii) HIPOTÉTICO: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vi) ORIGEM PRIMITIVA:
 - (A) ORGANISMO:
- (vii) ORIGEM IMEDIATA:
 - (B) CLONE:
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

Met Thr Val Arg Lys Asn Gln Ala Ser Leu Thr Ala Glu Glu Lys
5 10 15

Arg Arg Phe Val Ala Ala Leu Leu Glu Leu Lys Arg Thr Gly Arg
20 25 30
Tyr Asp Ala Phe Val Thr Thr His Asn Ala Phe Ile Leu Gly Asp
35 40 45
Thr Asp Asn Gly Glu Arg Thr Gly His Arg Ser Pro Ser Phe Leu
50 55 60
Pro Trp His Arg Arg Phe Leu Leu Glu Phe Glu Arg Ala Leu Gln
65 70 75
Ser Val Asp Ala Ser Val Ala Leu Pro Tyr Trp Asp Trp Ser Ala
80 85 90
Asp Arg Ser Thr Arg Ser Ser Leu Trp Ala Pro Asp Phe Leu Gly
95 100 105
Gly Thr Gly Arg Ser Arg Asp Gly Gln Val Met Asp Gly Pro Phe
110 115 120
Ala Ala Ser Ala Gly Asn Trp Pro Ile Asn Val Arg Val Asp Gly
125 130 135
Arg Thr Phe Leu Arg Arg Ala Leu Gly Ala Gly Val Ser Glu Leu
140 145 150
Pro Thr Arg Ala Glu Val Asp Ser Val Leu Ala Met Ala Thr Tyr
155 160 165
Asp Met Ala Pro Trp Asn Ser Gly Ser Asp Gly Phe Arg Asn His
170 175 180
Leu Glu Gly Trp Arg Gly Val Asn Leu His Asn Arg Val His Val
185 190 195
Trp Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Gly Val Ser Pro Asn Asp Pro
200 205 210
Val Phe Trp Leu His His Ala Tyr Ile Asp Lys Leu Trp Ala Glu
215 220 225
Trp Gln Arg Arg His Pro Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Gly Gly Gly
230 235 240
Thr Pro Asn Val Val Asp Leu Asn Glu Thr Met Lys Pro Trp Asn
245 250 255
Asp Thr Thr Pro Ala Ala Leu Leu Asp His Thr Arg His Tyr Thr
260 265 270
Phe Asp Val Trp Asn Ser Ala Glu Leu Thr Arg Arg Arg Ala Leu
275 280 285
Gly Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Val Pro Leu Val Ala Leu
290 295 300
Pro Ala Ala Arg Ala Asp Asp Arg Gly His His Thr Pro Glu Val
305 310 315
Pro Gly Asn Pro Ala Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Phe Asp Glu
320 325 330
Ile Tyr Lys Gly Arg Arg Ile Gln Gly Arg Thr Val Thr Asp Gly
335 340 345
Gly Gly His His Gly Gly Gly His Gly Gly Asp Gly His Gly Gly
350 355 360
Gly His His Gly Gly Gly Tyr Ala Val Phe Val Asp Gly Val Glu
365 370 375
Leu His Val Met Arg Asn Ala Asp Gly Ser Trp Ile Ser Val Val
380 385 390
Ser His Tyr Glu Pro Val Asp Thr Pro Arg Ala Ala Ala Arg Ala
395 400 405
Ala Val Asp Glu Leu Gln Gly Ala Arg Leu Leu Pro Phe Pro Ser
410 415 420
Asn Gly

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:



- (A) COMPRIMENTO: 36
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

- (A) DESCRIÇÃO: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) ORIGEM PRIMITIVA:

- (A) ORGANISMO:

(vii) ORIGEM IMEDIATA:

- (B) CLONE:

(ix) CARACTERÍSTICA:

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

CCAGGGCGCC CGGCTCCTCC CCTTCCCCTC CAACCA

36

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 42
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

- (A) DESCRIÇÃO: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) ORIGEM PRIMITIVA:

- (A) ORGANISMO:

(vii) ORIGEM IMEDIATA:

- (B) CLONE:

(ix) CARACTERÍSTICA:

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

TCGAGGTCCC GCGGGCCGAG GAGGGGAAGG GGAGGTTGGT AT

42

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 4009
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

- (A) DESCRIÇÃO: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) ORIGEM PRIMITIVA:

- (A) ORGANISMO:



- (vii) ORIGEM IMEDIATA:
 - (B) CLONE:
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT60
GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC120
GTGTAGATAA CTACGATAACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC180
GAGACCCACG CTGACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG240
AGCGCAGAAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTGCCGGG300
AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATGCTACAG360
GCATCGTGGT GTCACGCTCG GCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT420
CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCTC480
CGATCGTTGT CAGAAGTAAAG TTGGCCGCGAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC540
ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA600
CCAAGTATTT GGAAGATGCG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAACA CGGGATAATA660
CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGCGAA720
AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGACCCA780
ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC840
AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTCC900
TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG960
AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC1020
CTGACGCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACTA TAAAAATAGG CGTATCAGGA1080
GGCCCTTTCG TCTTCAAGAA ttaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataatctcat1140
gacaaaaatc ccttaacgtg agttttcggt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat1200
caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa1260
accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa1320
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagt1380
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gectacatac ctgctctgc taatcctgt1440
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata1500
gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagct1560
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac1620
gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggaga1680
gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggatctt tatagtctg tcgggtttcg1740
ccacctctga cttgagcgtc gatttttgat atgctcgtca gggggcgga gcctatggaal800
aaagccagc aacgcggcct tttacggtt cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat1860
gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgct ttgagtgagc1920
tgataccgct cgccgagcc gaacgaccga gcgagcagag tcagtgagc aggaagcgga1980
agagcgcctg atgcggtatt ttctcttac gcatctgtgc ggtatctcac accgcaCAGA2040



TCTGtggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact2100
ccgctatcgc tacgtgactg ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac2160
gcgcctgac gggcttgtct gctccccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc2220
gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gCCagctgC2280
GATTCGAAct tctcgattcg aacttctgat agacttcgaa attaatacga ctactatag2340
ggagaccaca.acggtttccc TCTAGAAata attttgttta actttaagaa ggagatatac2400
atATGGCTAG AATGGCcatg GCGGAACTCA CCCGTCGTCG CGCGCTCGGC GCCGAGCCG2460
TCGTCGCCGC CGGTGTCCCG CTGGTCGCC TTCCCGCCGC CCGCGCGGAC GATCGGGGGC2520
ACCACACCCC CGAGGTCCCC GGAACCCGG CCGCGTCCGG CGCCCCGCC GCCTTCGACG2580
AGATCTACAA GGGCCGCCG ATACAGGGCC GGACGGTCAC CGACGGCGGG GGCCACCACG2640
GCGGCGGTCA CGGCGGTGAC GGTACCGGC GCGGCCATCA CGGCGCGGGT TACGCCGTGT2700
TCGTGGACGG CGTCGAACTG CATGTGATGC GCAACGCCGA CGGCTCGTG ATCAGCGTCG2760
TCAGCCACTA CGAGCCGGTG GACACCCCG CCGCCCGGC CCGCGCTGCG GTCGACGAGC2820
TCCAGGGCGC CCGGTCCTC CCCTTCCCCT CCAACcatAT GACCGTCCGC AAGAACCAGG2880
CGTCCCTGAC CGCCGAGGAG AAGCGCCGCT TCGTCGCCGC CCTGCTCGAA CTCAAGCGCA2940
CCGGCCGTA CGACGCCTTC GTCACCACGC ACAACCGGTT CATCCTGGGC GACACCACA3000
ACGGCGAGCG CACCGGCCAC CGTTCGCCGT CCTTCCTGCC CTGGCACCGC AGATTTCTGC3060
TGGAGTTTGA GCGGGCGCTC CAGTCGGTGG ACGCGTCGGT GGGCTGCCG TACTGGGACT3120
GGTCCGCCGA CCGGTCCACC CGGTCTCGC TGTGGGCGCC GGAATTCCTC GGCGGCACCG3180
GGCGAGCCG GGACGGCCAG GTGATGGACG GGCCGTTCGC CGCGTCGGCC GGCAACTGGC3240
CGATCAATGT GCGGGTGGAC GGCCGTACGT TCCTGCGCG GCGCTCGGC GCGGGCGTGA3300
GGAACTGCC CACGCGTCC GAGGTGACT CGGTGCTGGC GATGGCGACG TACGACATGG3360
CGCCCTGGAA CAGCGGCTCC GACGGCTTC GCAACCATCT CGAAGGGTGG CGCGGGTCA3420
ATCTGCACAA CCGGGTGCAT GTCTGGGTCG GCGGCCAGAT GGCGACCGGG GTCTCCCCCA3480
ACGACCCGGT GTTCTGGCTG CACCACGCCT ACATCGACAA GCTGTGGGCC GAGTGGCAGC3540
GCCGGCACCC CTCGTCCCCG TATCTGCCGG GCGGCGGCAC GCCGAACGTC GTCGACCTCA3600
ACGAGACGAT GAAGCCGTGG AACGACACCA CCCC GGCGGC CCTGCTGGAC CACACCCGGC3660
ACTACACCTT CGACGTctga tcatcactga cgaatcgagg tcgaggaacc gagcgtccga3720
ggaacagagg cgcttatcgg ttggccgca gattcctgtc gatcctctcg tgcagcgca3780
ttccgagga aacggaaacg ttgagagact cggctctgct catcatgggg atggaaaccg3840
aggcggaaga cgcctcctcg aacaggtcgg aaggcccacc cttttcgctg ccgaacagca3900
aggccagccg atccggattg tccccgagtt ccttcacgga aatgtcgcca tccgccttga3960
gcgtcatcag ATCaagcttA TCGATGATAA GCTGTCAAAC ATGAGAATT 4009

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 426
 - (B) TIPO: ácidos aminados
 - (C) CADEIA:
 - (D) TOPOLOGIA: circular



- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
 - (A) DESCRIÇÃO: proteína
- (iii) HIPOTÉTICO: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vi) ORIGEM PRIMITIVA:
 - (A) ORGANISMO:
- (vii) ORIGEM IMEDIATA:
 - (B) CLONE:
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

MET ALA ARG ILE ALA MET ALA GLU LEU THR ARG ARG ARG ALA LEU
5 10 15
GLY ALA ALA ALA VAL VAL ALA ALA GLY VAL PRO LEU VAL ALA LEU
20 25 30
PRO ALA ALA ARG ALA ASP ASP ARG GLY HIS HIS THR PRO GLU VAL
35 40 45
PRO GLY ASN PRO ALA ALA SER GLY ALA PRO ALA ALA PHE ASP GLU
50 55 60
ILE TYR LYS GLY ARG ARG ILE GLN GLY ARG THR VAL THR ASP GLY
65 70 75
GLY GLY HIS HIS GLY GLY GLY HIS GLY GLY ASP GLY HIS GLY GLY
80 85 90
GLY HIS HIS GLY GLY GLY TYR ALA VAL PHE VAL ASP GLY VAL GLU
95 100 105
LEU HIS VAL MET ARG ASN ALA ASP GLY SER TRP ILE SER VAL VAL
110 115 120
SER HIS TYR GLU PRO VAL ASP THR PRO ARG ALA ALA ALA ARG ALA
125 130 135
ALA VAL ASP GLU LEU GLN GLY ALA ARG LEU LEU PRO PHE PRO SER
140 145 150
ASN HIS MET THR VAL ARG LYS ASN GLN ALA SER LEU THR ALA GLU
155 160 165
GLU LYS ARG ARG PHE VAL ALA ALA LEU LEU GLU LEU LYS ARG THR
170 175 180
GLY ARG TYR ASP ALA PHE VAL THR THR HIS ASN ALA PHE ILE LEU
185 190 195
GLY ASP THR ASP ASN GLY GLU ARG THR GLY HIS ARG SER PRO SER
200 205 210
PHE LEU PRO TRP HIS ARG ARG PHE LEU LEU GLU PHE GLU ARG ALA
215 215 220
LEU GLN SER VAL ASP ALA SER VAL ALA LEU PRO TYR TRP ASP TRP
225 230 235
SER ALA ASP ARG SER THR ARG SER SER LEU TRP ALA PRO ASP PHE
240 245 250
LEU GLY GLY THR GLY ARG SER ARG ASP GLY GLN VAL MET ASP GLY
255 260 265
PRO PRE ALA ALA SER ALA GLY ASN TRP PRO ILE ASN VAL ARG VAL
270 275 280
ASP GLY ARG THR PHE LEU ARG ARG ALA LEU GLY ALA GLY VAL SER
285 290 295
GLU LEU PRO THR ARG ALA GLU VAL ASP SER VAL LEU ALA MET ALA
300 305 310
THR TYR ASP MET ALA PRO TRP ASN SER GLY SER ASP GLY PRE ARG
315 320 325
ASN HIS LEU GLU GLY TRP ARG GLY VAL ASN LEU HIS ASN ARG VAL

HIS VAL TRP VAL	330	335	340
GLY GLY GLN MET ALA THR	GLY VAL SER PRO	ASK	
	345	350	355
ASP PRO VAL PHE TRP LEU HIS HIS ALA TYR ILE ASP LYS LEU	TRP		
	360	370	375
ALA GLU TRP GLN ARG ARG HIS PRO SER SER PRO TYR LEU PRO	GLY		
	380	385	390
GLY GLY THR PRO ASN VAL VAL ASP LEU ASN GLU THR MET LYS	PRO		
	395	400	405
TRP ASN ASP THR THR PRO ALA ALA LEU LEU ASP HIS THR ARG	HIS		
	410	415	420
TYR THR PHE ASP VAL GLY			
	425		

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 1442
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA:
 - (A) DESCRIÇÃO: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NÃO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NÃO
- (vi) ORIGEM PRIMITIVA:
 - (A) ORGANISMO:
- (vii) ORIGEM IMEDIATA:
 - (B) CLONE
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

ctcgagccAT GGCTTCCTCA GTTCTTTCCT CTGCAGCAGT TGCCACCCGC AGCAATGTTG60
CTCAAGCTAA CATGGTTGCA CCTTTCCTG GCCTTAAGTC AGCTGCCTCA TTCCCTGTTT120
CAAGGAAGCA AACCTTGAC ATCACTTCCA TTGCCAGCAA CGGCGGAAGA GTGCAATGCA180
TGCCGGAAC CACCCGTCGT CGCGCGCTCG GCGCCGAGC CGTCGTCGCC GCCGGTGTCC240
CGCTGGTCGC CCTTCCCGCC GCCCGCGCGG ACGATCGGGG GCACCACACC CCCGAGGTCC300
CCGGAACCC GGCCGCGTCC GCGCCCCCG CCGCCTTCGA CGAGATCTAC AAGGGCCGCC360
GGATACAGGG CCGGACGGTC ACCGACGGCG GGGGCCACCA CGGCGGCGGT CACGGCGGTG420
ACGGTCACGG CCGCGGCCAT CACGGCGGCG GTTACGCCGT GTTCGTGGAC GGCGTCGAAC480
TGCAATGAT GCGCAACGCC GACGGCTCGT GGATCAGCGT CGTCAGCCAC TACGAGCCGG540
TGGACACCCC CCGCGCCGCG GCCCGCGCTG CCGTCGACGA GCTCCAGGGC GCCCGGCTCC600
TCCCCTTCCC,CTCAAACCAT ATGACCGTCC GCAAGAACCA GCGTCCCTG ACCGCCGAGG660
AGAAGCGCCG CTCGTCGCC GCCCTGCTCG AACTCAAGCG CACCGGCCGC TACGAGCCCT720
TCGTACCAC GCACAACGCG TTCATCCTGG GCGACACCGA CAACGGCGAG CGCACCGGCC780
ACGGTTCGCC GTCCTTCTCG CCTTGGCACC GCAGATTTCT GCTGGAGTTC GAGCGGGCGC840
TCCAGTCGGT GGACGCGTGC GTGGCGCTGC CCTACTGGGA CTGGTCCGCC GACCAGTCCA900

CCCAGTCTC GCTGTGGGCG CCGGACTTCC TCGGCGGCAC CGGGCGCAGC CGGGACGGCC960
AGGTGATGGA CCGGCCGTTT GCCCGCTCGG CCGGCAACTG GCCGATCAAT GTGCGGGTGG1020
ACGGCCGTAC GTTCTTGGCG CCGGCGCTCG GCGCGGGCGT GAGCGAACTG CCCACGCGTG1080
CCCAGGTCGA CTCGGTGCTG GCGATGGCGA CGTACGACAT GCGGCCCTGG AACAGCGGCT1140
CCGACGGCTT CCGCAACCAT CTCGAAGGGT GCGCGGGGGT CAATCTGCAC AACCGGGTGC1200
ATGTCTGGGT CCGCGGCCAG ATGGCGACCG GGGTCTCCCC CAACGACCCG GTGTCTGGC1260
TGCACCACGC CTACATCGAC AAGCTGTGGG CCGAGTGGCA GCGGCGGCAC CCCTCGTCCC1320
CGTATCTGCC GGGCGGCGGC ACGCCGAACG TCGTGCACCT CAACGAGACG ATGAAGCCGT1380
GGAACCACAC CACCCCGGCG GCCCTGCTGG ACCACACCCG GCACTACACC TTCGACGTCT1440
GA 1442

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 478
- (B) TIPO: ácidos aminados
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

- (A) DESCRIÇÃO: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) ORIGEM PRIMITIVA:

- (A) ORGANISMO:

(vii) ORIGEM IMEDIATA:

- (B) CLONE:

(ix) CARACTERÍSTICA:

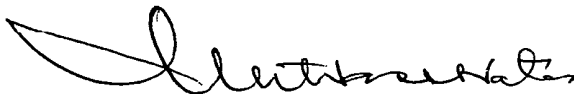
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:

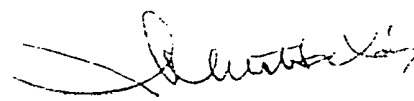
Met	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Arg	Ser	
				5					10					15	
Asn	Val	Ala	Gln	Ala	Asn	Met	Val	Ala	Pro	Phe	Thr	Gly	Leu	Lys	
				20					25					30	
Ser	Ala	Ala	Ser	Phe	Pro	Val	Ser	Arg	Lys	Gln	Asn	Leu	Asp	Ile	
				35					40					45	
Thr	Ser	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Arg	Val	Gln	Cys	Met	Pro	Glu	
				50					55					60	
Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Ala	
				65					70					75	
Gly	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Asp	Asp	Arg	
				80					85					90	
Gly	His	His	Thr	Pro	Glu	Val	Pro	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	
				95					100					105	
Ala	Pro	Ala	Ala	Phe	Asp	Glu	Ile	Tyr	Lys	Gly	Arg	Arg	Ile	Gln	
				110					115					120	
Gly	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Gly	Gly	Gly	His	
				125					130					135	
Gly	Gly	Asp	Gly	His	Gly	Gly	Gly	His	His	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ala	
				140					145					150	
Val	Phe	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Leu	His	Val	Met	Arg	Asn	Ala	Asp	

	155		160		165
Gly Ser Trp Ile	Ser Val Val Ser His	Tyr Glu Pro Val Asp Thr			
	170		175		180
Pro Arg Ala Ala	Ala Arg Ala Ala Val	Asp Glu Leu Gln Gly Ala			
	185		190		195
Arg Leu Leu Pro	Phe Pro Ser Asn His	Met Thr Val Arg Lys Asn			
	200		205		210
Gln Ala Ser Leu	Thr Ala Glu Glu Lys	Arg Arg Phe Val Ala Ala			
	215		215		220
Leu Leu Glu Leu	Lys Arg Thr Gly Arg	Tyr Asp Ala Phe Val Thr			
	225		230		235
Thr His Asn Ala	Phe Ile Leu Gly Asp	Thr Asp Asn Gly Glu Arg			
	240		245		250
Thr Gly His Arg	Ser Pro Ser Phe Leu	Pro Trp His Arg Arg Phe			
	255		260		265
Leu Leu Glu Phe	Glu Arg Ala Leu Gln	Ser Val Asp Ala Ser Val			
	270		275		280
Ala Leu Pro Tyr	Trp Asp Trp Ser Ala	Asp Arg Ser Thr Arg Ser			
	285		290		295
Ser Leu Trp Ala	Pro Asp Phe Leu Gly	Gly Thr Gly Arg Ser Arg			
	300		305		310
Asp Gly Gln Val	Met Asp Gly Pro Phe	Ala Ala Ser Ala Gly Asn			
	315		320		325
Trp Pro Ile Asn	Val Arg Val Asp Gly	Arg Thr Phe Leu Arg Arg			
	330		335		340
Ala Leu Gly Ala	Gly Val Ser Glu Leu	Pro Thr Arg Ala Glu Val			
	345		350		355
Asp Ser Val Leu	Ala Met Ala Thr Tyr	Asp Met Ala Pro Trp Asn			
	360		370		375
Ser Gly Ser Asp	Gly Phe Arg Asn His	Leu Glu Gly Trp Arg Gly			
	380		385		390
Val Asn Leu His	Asn Arg Val His Val	Trp Val Gly Gly Gln Met			
	395		400		405
Ala Thr Gly Val	Ser Pro Asn Asp Pro	Val Phe Trp Leu His His			
	410		415		420
Ala Tyr Ile Asp	Lys Leu Trp Ala Glu	Trp Gln Arg Arg His Pro			
	425		430		435
Ser Ser Pro Tyr	Leu Pro Gly Gly Gly	Thr Pro Asn Val Val Asp			
	440		445		450
Leu Asn Glu Thr	Met Lys Pro Trp Asn	Asp Thr Thr Pro Ala Ala			
	455		460		465
Leu Leu Asp His	Thr Arg His Tyr Thr	Phe Asp Val Gly			
	470		475		

Lisboa, 26 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL





REIVINDICAÇÕES

1. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma tirosinase e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma proteína activadora de tirosinase, em que a proteína activadora é seleccionada do grupo constituído por ORF438 e ORF402.
2. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência da proteína activadora está posicionada a 5' em relação à sequência de tirosinase.
3. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência de tirosinase está posicionada a 5' em relação à sequência da proteína activadora
4. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 1 que compreende adicionalmente uma sequência adaptadora posicionada entre as sequências de ácidos nucleicos que codificam para a proteína activadora e a tirosinase.
5. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 4, em que a sequência de ácidos nucleicos que codifica para a proteína activadora está posicionada a 5' em relação à sequência de ácidos nucleicos que codifica para a tirosinase.
6. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 5, em que a tirosinase é derivada de um procarionte, em particular de Streptomyces.

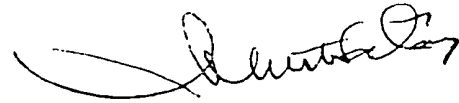


7. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína activadora é ORF438 e a tirosinase é derivada de S. antibioticus.
8. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 4, em que a sequência adaptadora codifica para um único ácido aminado, em particular para um resíduo de histidina.
9. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão de acordo com a reivindicação 8, em que a sequência adaptadora codifica para uma sequência de ácidos aminados repetitiva Pro-Thr.
10. Vector para a transformação de um organismo que compreende:
uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão, a qual compreende uma sequência de ácidos aminados para uma tirosinase e uma sequência de ácidos aminados que codifica para uma proteína activadora de tirosinase; e uma sequência promotora que regula a transcrição da enzima de fusão, em que a proteína activadora é seleccionada do grupo constituído por ORF438 e ORF402.
11. Vector de acordo com a reivindicação 10, em que a sequência da proteína activadora está posicionada a 5' em relação à sequência da tirosinase.
12. Vector de acordo com a reivindicação 10, em que a sequência da tirosinase está posicionada a 5' em relação à sequência da proteína activadora.
13. Vector de acordo com a reivindicação 10, em que a tirosinase é derivada de um procarionte, em particular de Streptomyces.
14. Vector de acordo com a reivindicação 10, em que a



tirosinase é derivada de S. antibioticus.

15. Vector de acordo com a reivindicação 10, em que a proteína activadora é ORF438 e a tirosinase é S. antibioticus.
16. Vector de acordo com a reivindicação 10, que compreende adicionalmente uma sequência adaptadora posicionada entre as sequências de ácidos nucleicos que codificam para a proteína activadora e a tirosinase.
17. Vector de acordo com a reivindicação 16, em que a sequência adaptadora codifica para um único ácido aminado, em particular para um resíduo de histidina.
18. Vector de acordo com a reivindicação 16, em que a sequência adaptadora codifica para uma sequência de ácidos aminados repetitiva Pro-Thr.
19. Enzima de fusão que compreende uma sequência de ácidos aminados para tirosinase e uma sequência de ácidos aminados para uma proteína activadora de tirosinase, em que a proteína activadora é seleccionada do grupo constituído por ORF438 e ORF402.
20. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 19, que compreende adicionalmente um adaptador posicionado entre as sequências de ácidos aminados da proteína activadora e da tirosinase.
21. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 20, em que a sequência adaptadora compreende um único ácido aminado, em particular um resíduo de histidina.
22. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 20, em que a sequência adaptadora compreende uma sequência de ácidos aminados repetitiva Pro-Thr.
23. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 19, em que a sequência da proteína activadora está posicionada na extremidade terminal N da sequência da tirosinase.



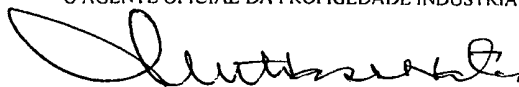
24. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 19 ou 23, em que a tirosinase é derivada de um procarionte, em particular de Streptomyces.
25. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 19, em que a proteína activadora é ORF438 e a tirosinase é derivada de S. antibioticus.
26. Enzima de fusão de acordo com a reivindicação 19, em que a sequência da proteína activadora está posicionada na extremidade terminal C da sequência da tirosinase.
27. Método in vitro para a produção de uma melanina que compreende as fases de fazer contactar uma enzima de fusão que compreende uma sequência de ácidos aminados para tirosinase e uma sequência de ácidos aminados para uma proteína activadora de tirosinase com um substrato de reacção seleccionado do grupo constituído por L-tirosina, X/L-tirosina, L-tirosina/X e X/L-tirosina/X, em que X é um único ácido aminado, um dipeptídeo ou um oligopeptídeo ligado a L-tirosina, sob condições de reacção adequadas para formar melanina, em que a proteína activadora é seleccionada do grupo constituído por ORF438 e ORF402.
28. Organismo não humano que foi transformado com um vector que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão, enzima de fusão esta que compreende uma sequência de ácidos aminados para uma tirosinase e uma sequência de ácidos aminados que codifica para uma proteína activadora de tirosinase; e uma sequência promotora que regula a transcrição da enzima de fusão, em que a proteína activadora é seleccionada do grupo constituído por ORF438 e ORF402.
29. Organismo de acordo com a reivindicação 28, em que o organismo transformado é seleccionado do grupo constituído por bactérias, fungos e leveduras, plantas e animais.

30. Método para a produção de melaninas que compreende as fases de cultivar um organismo não humano que foi transformado com um vector que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma enzima de fusão, enzima de fusão esta que compreende uma sequência de ácidos aminados para uma tirosinase e uma sequência de ácidos aminados que codifica para uma proteína activadora de tirosinase, em que a proteína activadora é seleccionada do grupo constituído por ORF438 e ORF402, e uma sequência promotora que regula a transcrição da enzima de fusão.

31. Método de acordo com a reivindicação 30 que compreende a fase adicional de isolamento da melanina produzida.

Lisboa, 26 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



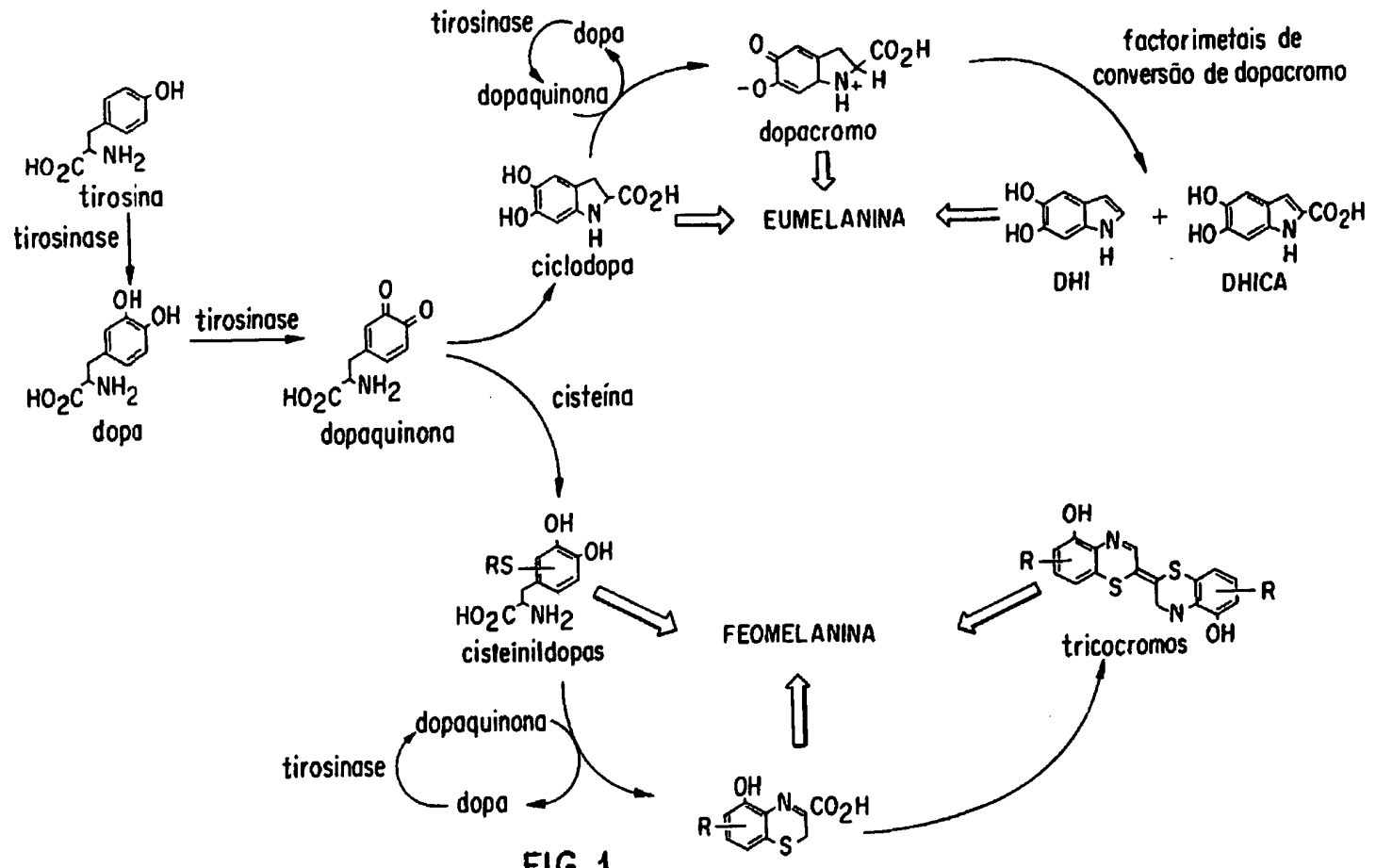


FIG. 1

Handwritten signature

Handwritten signature

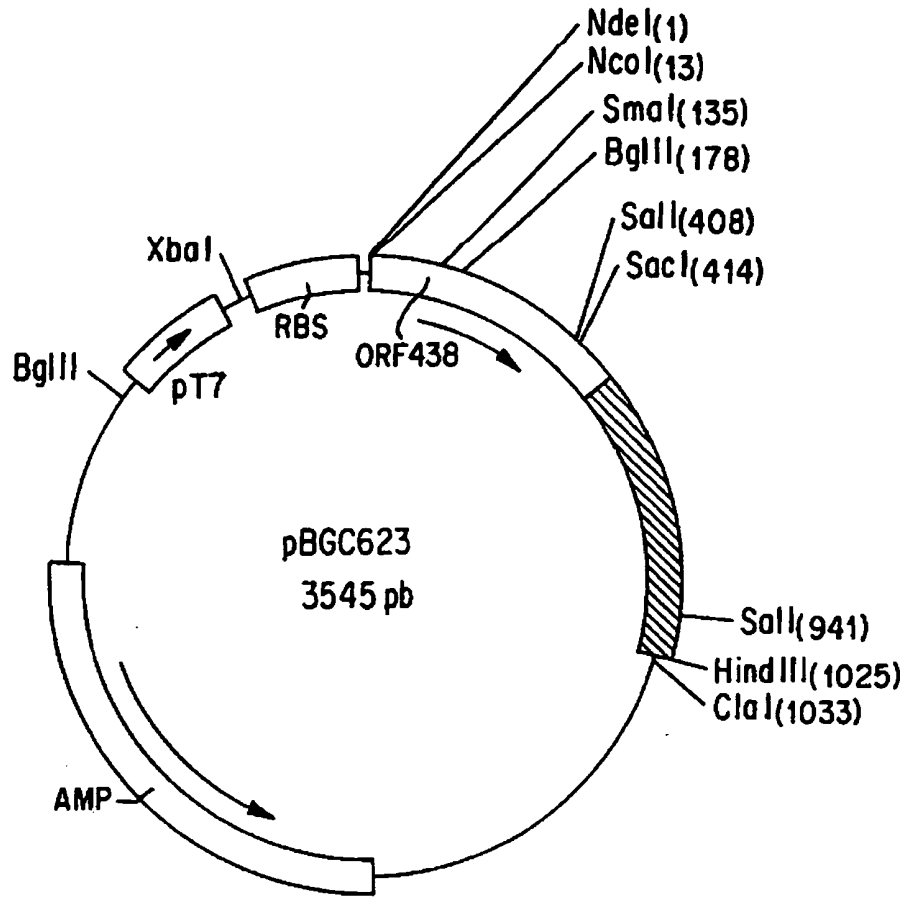


FIG. 2

[Handwritten signature]

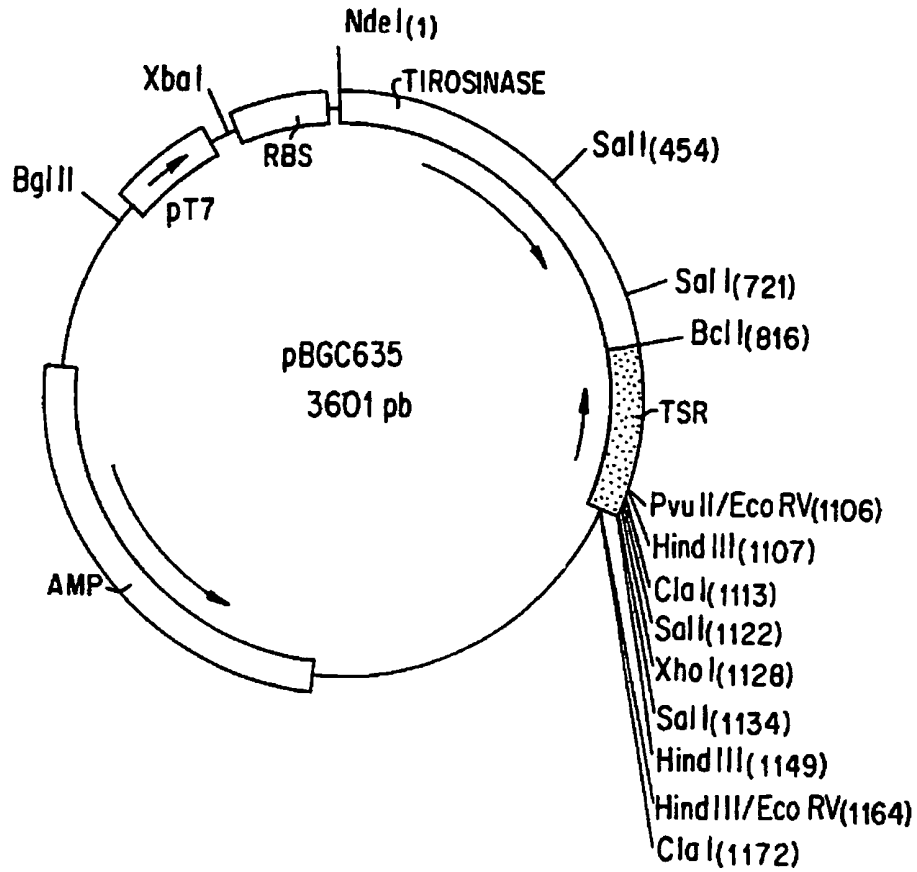


FIG. 3

[Handwritten signature]

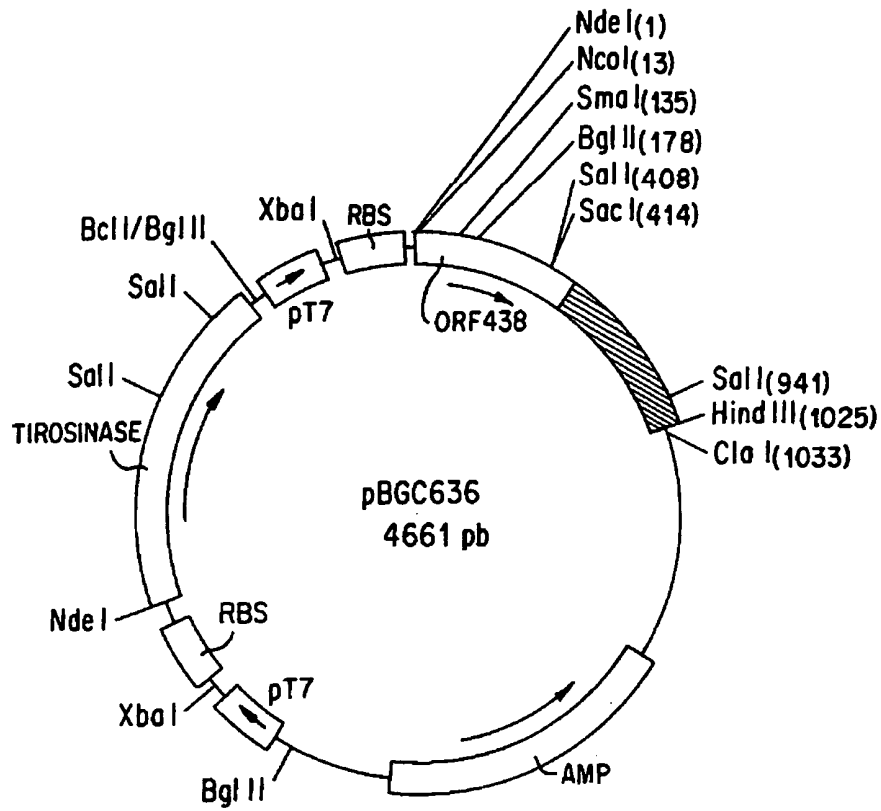


FIG. 4

[Handwritten signature]

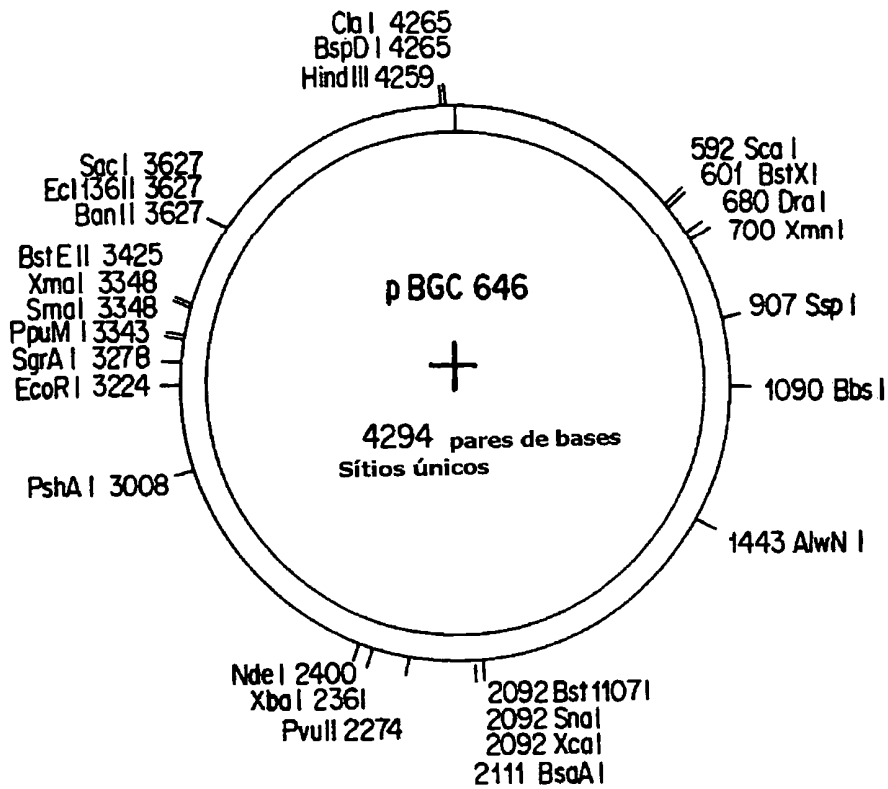


FIG. 5

[Handwritten signature]

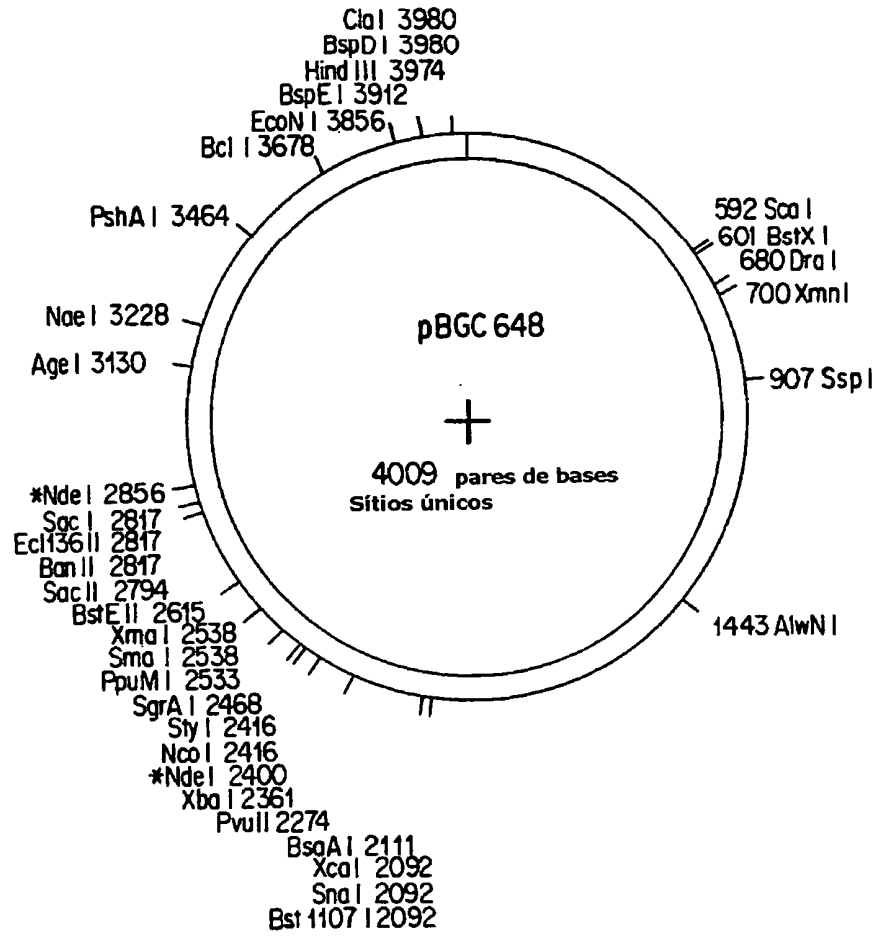


FIG. 6

