



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9913698-8 B1

(22) Data do Depósito: 15/09/1999

(45) Data de Concessão: 21/06/2016



(54) Título: PEPTÍDEO SINALIZADOR DE ENTEROTOXINA II DE E. COLI MODIFICADO E UM MICROORGANISMO EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE FUSÃO DO PEPTÍDEO E UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA

(51) Int.Cl.: C07K 14/245; C12N 15/70; C12N 15/62; C12N 1/21

(30) Prioridade Unionista: 15/09/1998 KR 1998/38061

(73) Titular(es): HANMI SCIENCE CO., LTD.

(72) Inventor(es): SE-CHANG KWON, SUNG-YOUB JUNG, HOON SHIN, JAY DO CHOI, KI DOO CHOI, GWAN-SUN LEE

"PEPTÍDEO SINALIZADOR DE ENTEROTOXINA II DE *E. COLI* MODIFICADO E UM MICROORGANISMO EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE FUSÃO DO PEPTÍDEO E UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA"

Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere a um peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E. coli*, um gene codificando tal peptídeo, um vetor compreendendo o gene fundido a um gene codificando uma proteína heteróloga, um microorganismo transformado com o vetor e a um processo para produzir a
10 proteína heteróloga usando o microorganismo.

Histórico da Invenção

Muitas proteínas heterólogas foram produzidas usando microorganismos hospedeiros geneticamente transformados por um processo intracelular ou processo de secreção.

15 No processo intracelular, um gene codificando uma proteína heteróloga é expresso e acumulado no citoplasma de um microorganismo. Embora este processo seja conhecido por fornecer um rendimento de proteína heterólogo relativamente alto, a proteína heteróloga expressa não é de uma forma natural ativa, porém metionilada no terminal N. Adicionalmente,
20 a proteína heteróloga biologicamente inativa produzida por este processo frequentemente forma corpos de inclusão insolúveis que devem ser solubilizados e convertidos em uma forma natural, ativa, por um processo de reentrelaçamento.

25 Como para o processo de secreção, um gene codificando uma proteína de fusão de um peptídeo de sinal e proteína heteróloga é expresso no citoplasma de um microorganismo e, então, a proteína de fusão é processada pela pepti-

dase de sinal do microorganismo para remover o peptídeo de sinal, enquanto passando através da membrana citoplásmica. A proteína processada é secretada no espaço do periplasma entre a membrana citoplásmica (interna) e a membrana externa do microorganismo. Contudo, este processo é conhecido por fornecer um rendimento muito baixo da proteína heteróloga, quando comparado ao processo intracelular. Portanto, há uma necessidade de aperfeiçoar a produtividade do processo de secreção. Nesta linha, foi reportado que a clivagem apurada e eficiente da porção do peptídeo sinalizador de uma proteína de fusão expressa pela peptidase sinalizadora é importante na melhora do rendimento da proteína heteróloga secretada (Akita, M. e outros, J. Biol. Chem., 265, 8164 (1990)).

Em geral, os peptídeos sinalizadores são classificados em dois grupos, peptídeos sinalizadores hidrófilos e peptídeos sinalizadores hidrófobos. Um peptídeo sinalizador hidrófilo é geralmente composto de 12 a 70 aminoácidos. Um peptídeo sinalizador hidrófobo típico, por exemplo, peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli*, contém 13 a 30 aminoácidos e é compreendido de três regiões; uma região hidrófila de terminal N contendo um ou dois aminoácidos básicos; uma região hidrófoba central contendo cerca de 10 aminoácidos básicos e uma região hidrófila de terminal C contendo aminoácidos possuindo cadeias laterais pequenas.

Como uma proteína heteróloga expressa na forma de uma proteína de fusão com um peptídeo sinalizador é frequentemente degradada rapidamente pela proteinase citoplásmica, o rendimento da proteína heteróloga secretada diminui con-

forme a eficiência secretória do peptídeo sinalizador torna-se baixa. Portanto, o rendimento das proteínas heterólogas secretadas pode ser melhorado por modificação da porção de peptídeo sinalizador de proteínas de fusão expressas nos microorganismos hospedeiros.

O hormônio do crescimento humano (hGH) é composto de 191 aminoácidos e possui um peso molecular de 21.500 Da. Uma vez que uma forma purificada de hGH foi isolada primeiro da pituitária humana em 1956 (Li e Papkoff, Science, 124, 1293 (1956)), foram realizados vários trabalhos no hGH para elucidar, por exemplo, o efeito do hGH no metabolismo humano (Beck, J.C. e outros, Science, 125, 884 (1957)) e atividade inibidora de hGH na nanocormia pituitária (Raben, M.S., J. Clin. Endocrinol., 18, 901 91958)). Recentemente, foi reportado que hGH é também eficaz no tratamento da síndrome de Turner, osteoporose, "vulnus" e queimadura.

Como a quantidade de hGH obtida da pituitária humana é limitada, tem sido feita uma tentativa de produção de uma grande quantidade de hGH no *E.coli* geneticamente transformado por um processo intracelular (Goeddel, D.V. e outros, Nature, 281, 544 (1979)). Contudo este processo é impedido pelo problema mencionado anteriormente de produção de hGH metionilado que não é apropriado para aplicação humana. Uma tentativa adicional de remover a metionina do hGH metionilado usando aminopeptidase I de dipeptidila resultou em um rendimento inaceitavelmente baixo de hGH.

Conseqüentemente, a produção secretora de hGH natural foi tentada. Por exemplo, os EP números 55942, 20147 e

114695 revelam processos para expressar uma forma natural de hGH e recuperação da mesma por secreção. Contudo, a quantidade recuperável de hGH produzido por estes processos é apenas marginal.

5 O EP número 177.343 revela um processo para produção de hGH, que compreende a expressão de um gene codificando uma proteína de fusão de hGH e fosfatase alcalina ou peptídeo sinalizador de enterotoxina, em presença de um indutor de expressão, isopropiltio- β -D-galactosídeo (IPTG), e secretando hGH
10 dentro do periplasma. Contudo, o processo fornece um rendimento de hGH baixo e requer o uso do indutor de expressão caro, IPTG.

Conseqüentemente, existe a necessidade de desenvolver-se um processo mais eficaz para produção de hGH em rendimento alto.

15 Sumário da Invenção

Conseqüentemente, é um objetivo da presente invenção prover um peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli* que possa ser vantajosamente empregado em um processo de secreção de produção de uma proteína heteróloga para melhorar a eficiência da
20 secreção.

Outro objetivo da presente invenção é prover um gene codificando o peptídeo.

Um objetivo adicional da presente invenção é prover um vetor compreendendo o gene fundido ao gene codificando um proteína
25 heteróloga.

Um objetivo adicional da presente invenção é prover um microorganismo transformado com o vetor.

A figura 4 mostra o procedimento para construção do vetor pT14S1SH; e

A figura 5 reproduz o resultado da análise SDS-PAGE de hGH purificado.

5 Descrição Detalhada da Invenção

Entre os peptídeos sinalizadores de enterotoxina II de *E.coli* (MSTs) modificados da presente invenção, são preferidos aqueles onde:

o segundo aminoácido Lys não é substituído;

10 o quarto aminoácido Asn é substituído por Sr, Thr, Lys ou Gln;

o quinto aminoácido Ile não é substituído ou substituído por Thr ou Ser;

o décimo segundo aminoácido Met não é substituído
15 ou substituído por Ala, Gly, Val, Leu ou Ile;

o vigésimo aminoácido Asn não é substituído ou substituído por Ile, Phe, Ala ou Val; e

o vigésimo segundo aminoácido Tyr não é substituído ou substituído por Gln, Asn, Ala ou Lys.

20 Também preferidos são aqueles onde

o segundo aminoácido Lys é substituído por qualquer outro aminoácido;

o quarto aminoácido Asn é substituído por Lys;

o quinto aminoácido Ile é substituído por Ser,
25 Thr, Asn, Gln ou Arg;

o décimo segundo aminoácido Met não é substituído ou é substituído por Ala, Gly, Val, Leu ou Ile;

o vigésimo aminoácido Asn não é substituído ou é substituído por Ile, Phe, Ala ou Val; e

o vigésimo segundo aminoácido Tyr não é substituído ou substituído por Gln, Asn, Ala ou Lys.

5 MSTs mais preferidos são aqueles possuindo um dos seguintes conjuntos de substituição de aminoácido:

(a) o quarto Asn por Thr e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

(b) o quarto Asn por Thr, o vigésimo Asn por Val e
10 o vigésimo segundo Tyr por Gln;

(c) o quarto Asn por Lys, o quinto Ile por Thr e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

(d) o quarto Asn por Ser e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

15 (e) o quarto Asn por Ser, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

(f) o quarto Asn por Thr, o décimo segundo Met por Gly, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

20 (g) o quarto Asn por Thr, o décimo segundo Met por Leu, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

(h) o quarto Asn por Lys, o quinto Ile por Ser e o vigésimo segundo Tyr por Gln;

25 (i) o segundo Lys por Val, o quarto Asn por Lys, o quinto Ile por Thr e o vigésimo segundo Tyr por Gln; e

(j) o quarto Asn por Lys, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln.

O MST da presente invenção pode ser codificado por um gene compreendendo uma sequência de nucleotídeo deduzida da sequência de aminoácido de MST de acordo com o código genético. Sabe-se que vários códons diferentes codificando um mesmo aminoácido podem existir devido à degeneração do códon e, portanto, o MST da presente invenção inclui todas as sequências de nucleotídeo deduzidas da sequência de aminoácido de MST. Preferivelmente, o gene de MST pode incluir um ou mais códons preferidos de *E.coli*.

O gene MST pode ser preparado por mutação de um ou mais nucleotídeos do gene de peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli* nativo (designado gene STII) usando uma mutagenese dirigida ao sítio (Papworth, C. e outros, Strategies, 9, 3 (1996)). O gene de STII de *E.coli* pode ser obtido por utilização de um processo convencional (Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989)). Adicionalmente, o gene MST pode também ser sintetizado quimicamente.

O MST da presente invenção, quando fundido à proteína heteróloga, realiza uma secreção altamente eficaz da proteína heteróloga através da membrana citoplásmica de um microorganismo, por exemplo, *E.coli*. Conseqüentemente, usando um vetor de expressão compreendendo um gene MST fundido a um gene codificando uma proteína heteróloga, uma proteína de fusão de MST e proteína heteróloga (designada proteína MST/heteróloga) pode ser vantajosamente expressa no citoplasma de *E.coli*, a proteína de fusão sendo eficazmente pro-

cessada para remover a porção MST para liberar a proteína heteróloga rapidamente dentro do periplasma de *E.coli*. Assim, o uso do MST da invenção leva a uma razão muito melhorada de produção de proteína heteróloga.

5 A fusão do gene MST ao gene codificando uma proteína heteróloga pode ser conduzida de acordo com um processo de ligação convencional (Sambrook e outross, vide supra).

Proteínas heterólogas representativas incluem hormônio do crescimento humano (hGH), fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF), interferon, interleucina, 10 prouroquinase, insulina, fator VIII, hirudina, dismutase de superóxido e calcitonina, porém estes não limitam as proteínas heterólogas que podem ser usadas na presente invenção. Um gene codificando uma proteína heteróloga pode ser obtido 15 por um processo convencional, por exemplo, classificação de coletânea de cDNA e PCR.

O vetor de expressão da presente invenção pode compreender, adicionalmente, uma sequência Shine-Delgado de enterotoxina II de *E.coli* modificada (Sequência STII SD mo- 20 dificada) da seguinte sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 2) inserida imediatamente antes do códon de iniciação do gene MST:

5'-GAGGTGTTTT-3'

A sequência STII SD modificada é composta de uma 25 sequência STII SD longa de 4 nucleotídeos (GAGG) e uma sequência rica em T longa de 6 nucleotídeos. A sequência STII SD da sequência STII SD modificada provê um sítio de ligação de ribossoma muito forte, que melhora o nível de expressão

na ausência de um indutor de expressão, por exemplo, isopropiltio- β -D-galactosídeo (IPTG). A sequência rica em T da sequência STII SD modificada desempenha um papel importante na prevenção da formação de estruturas secundárias de mRNA transcritas da mesma, pelo que, melhorando a eficiência da expressão. A sequência de STII SD modificada pode ser preparada por processos convencionais (Sambrook e outros, vide supra), por exemplo, processo sintético químico. Adicionalmente, o gene SDII SD possuindo a seguinte sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 3) pode ser submetida a uma mutagenese dirigida ao sítio para obter a sequência STII SD modificada:

5'-GCTCTAGAGGTTGAGGTGTTTTATGAAAAAGAATA-3' (SEQ ID NO: 3)

A sequência STII SD modificada pode ser inserida na frente do códon de iniciação ATG de um gene MST ou a sequência STII SD precedendo o códon ATG de um gene MST pode ser modificada.

Vetores de expressão exemplares da presente invenção incluem pT14S1SH-4T22Q, pT14S1SH-4T20V22Q, pT14S1SH-4K5T22Q, pT14S1SH-4S22Q, pT14S1H-4S20V22Q, pT14S1SH-4T12G20V22Q, pT14S1SH-4T12L20V22Q, pT14SSH-4K5S22Q, pT14SSH-2V4K5t22Q e Pt14SSh-4K20V22Q que são preparados nos Exemplos 1 a 10 e os vetores preferidos são pT14S1SH-4T22Q e pT14S1SH-4T20V22Q.

Os vetores de expressão da presente invenção podem ser introduzidos no microorganismo, por exemplo, *E.coli*, de acordo com um processo de transformação convencional (Sambrook e outros, acima). Entre os microorganismos transformados, são preferidos os transformantes *E.coli* HM10011 e

HM10012 que foram depositados no Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) (Endereço: Department of Food Engineering, College of Eng., Yonsei University, Sodaemun-gu, Seoul 120-749, República da Coréia) em 12 de agosto de 1998 sob os
5 números de acesso KCCM-10137 e KCCM-10138, respectivamente, de acordo com os termos do Budapest Treaty on International Recognition of the Deposit of Microorganism para o Purpose of Patent Procedure.

Uma proteína heteróloga pode ser produzida por cultivo
10 de microorganismo transformante para expressar o gene que codifica a proteína de fusão MST/heteróloga e secretar uma proteína heteróloga para o periplasma e recuperar a proteína heteróloga do periplasma. O microorganismo transformante pode ser cultivado de acordo com um processo convencional (Sambrook e outros, acima). A
15 cultura de microorganismo pode ser centrifugada ou filtrada para coletar microorganismo secretando uma proteína heteróloga. O microorganismo transformado pode ser rompido de acordo com um processo convencional (Ausubel, F.M. e outros, Current Protocols in Molecular Biology (1989)) para obter uma solução periplásmica.
20 Por exemplo, o microorganismo pode ser rompido em uma solução hipotônica, por exemplo, água destilada, por um choque osmótico. A recuperação da proteína heteróloga na solução periplásmica pode ser conduzida por um processo convencional (Sambrook e outros, acima), por exemplo, cromatografia de troca de íon,
25 cromatografia de coluna de filtração de gel ou cromatografia de coluna imune. Por exemplo, hGH pode ser purificada por condução seqüencial de cromatografia de coluna de DEAE-

Separose, cromatografia de coluna de Fenil Separose e cromatografia de coluna Sephadex G-100.

A proteína heteróloga produzida de acordo com a presente invenção é de uma forma natural, não metionilada no terminal N e, portanto, pode ser usada como está em várias aplicações.

Os exemplos que se seguem são destinados a ilustrar, adicionalmente, a presente invenção sem limitar seu escopo.

Exemplo de Preparação 1: Classificação do Gene de cDNA
de Hormônio do Crescimento Humano

(Etapa 1) Construção da biblioteca de cDNA da pituitária humana

A 1 g da pituitária humana foram adicionados 10 ml de solução de guanidina (isocianato de guanidina 4M, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de EDTA e 5% de 2-mercaptoetanol) e homogeneizada. O homogenizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 6°C. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de 1/10 do Éter Sarkosil a 2% (Sigma, USA) e a mistura foi mantida a 65°C por 2 minutos. Cloreto de cério foi adicionado à solução resultante a uma concentração de 0,1 g/ml e a mistura foi centrifugada a 25.000 rpm por 16 horas sobre 9 ml de uma solução de enchimento (5,7 M CsCl e 0,1 mM EDTA) para obter precipitado de RNA. O precipitado foi dissolvido em 3 ml de solução de suspensão (5 mM EDTA, 0,5% Sarkosil, e 5% mercaptoetanol), e então extraída seqüencialmente com uma mistura de fenol/clorofórmico/álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v).

Aos extratos combinados foram adicionados volume 1/10 de acetato de sódio 3M e um volume 2,5 de etanol e a mistura foi centrifugada usando processo convencional (Sambrook e outros, supra) para obter precipitado de RNA. O precipitado
5 de RNA foi dissolvido em água destilada (D.W.) e mantido a 70°C por 10 minutos. Cloreto de lítio foi adicionado ao mesmo a uma concentração de 0,5 M e então submetido a cromatografia de oligo-dT-celulose (Tipo 3, Collaboratory Research, USA) para isolar poli (A)⁺ RNA de acordo com o processo de
10 Aviv e Leder (Avivi, H e Leder P., J. Mol. Biol., 134, 743 (1972)). O poli (A)⁺ RNA assim obtido foi tratado a 65°C por 5 minutos, resfriado a 0°C e adicionados imediatamente ao mesmo 20 µl de 5mM dNTPs, 40 µl de solução de tampão 5X (0,25 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,5 M KCl e 50 mM MgCl₂), 10 µl de
15 200 mM DTT, 20 µl de 0,5 mg/ml oligo (dT₁₂₋₁₈) (Pharmacia Inc., Suécia), 80 µl de água destilada, 10 µl (10 unidades) de RNasin (Promega, USA) e 20 µl (20 unidades) de transcriptase inversa AMV (Life Science Inc. USA). Após deixar a mistura reagir a 42°C por 90 minutos, 5 µl de 0,5 M EDTA (pH
20 8,0) e 200 µl de fenol tamponado tris foram adicionados a mistura de reação, misturados e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi extraído duas vezes com éter dietílico e os extratos combinados foram misturados com 20 µl de 3M acetato de sódio e 1
25 ml de etanol a 95% para precipitar cDNA de filamento simples precipitado (ss cDNA).

Para sintetizar o cDNA de filamento duplo (ds cDNA) do ss cDNA, o precipitado de sscDNA foi dissolvido em

284 µl de água destilada, e foram adicionados ao mesmo 40 µl de 5 mM NTPs, 80 µl de solução de tampão de segundo filamento (SS) 5X (250 mM Tris-HCl (pH 7,2), 450 mM de KCl, 15 mM de ditiotreitol, 15 mM de MgCl₂ e 0,25 mg/ml de albumina de soro bovino), 12 µl de 5 mM β-NAD⁺, 2 µl de 3000Ci/mmol [α-³²P]dCTP, 4 µl (4 unidades) de ligase de DNA *E.coli* e 10 µl (100 unidades) de polimerase I de DNA de *E.coli*. Após a mistura ser reagida a 14°C por 16 horas, a mistura de reação foi submetida a extração de fenol e precipitação de etanol conforme estabelecido acima, para obter precipitado de ds cDNA.

Para obtenção de uma extremidade cega de ds cDNA, o precipitado de cDNA foi dissolvido em 42 µl de água destilada e foram adicionados ao mesmo 5 µl de dNTPs, 16 µl de solução de tampão 5 X SS, 1 µl de 5 mM β-NAD⁺, 4 µl de RNase A (2 ug/ml, Biolabs, USA), 4 µl (4 unidades) de Rnase H, 2 µl (20 unidades) de ligase de DNA *E.coli* e 4 µl (8 unidades) de polimerase de DNA T4, seguido por reação da mistura a 37°C por 45 minutos. Após o término da reação, a mistura de reação foi submetida a extração de fenol e precipitação de etanol foi ajustada para obter precipitado de ds cDNA de extremidade cega.

Para proteger o sítio de restrição de EcoRI do ds cDNA por metilação, o precipitado de ds cDNA de extremidade cega foi dissolvido em 25 µl de água destilada e foram adicionados ao mesmo 27 µl de tampão 2 X metilase (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, e 1 mM de EDTA), 1 µl de solução 50 X SAM (1 mg de S-adenosilmetionina em 0,14 ml de acetato de

sódio (pH 5,2)) e 10 µl (10 unidades) de metilase de EcoRI (Biolabs, USA). Após deixar a mistura reagir a 37°C por duas horas, a mistura de reação foi submetida a extração de fenol e precipitação de etanol conforme descrito acima. O cDNA precipitado
 5 foi combinado com ligante EcoRI (Biolabs, USA) e a mistura foi reagida a 4°C por 16 horas, para obter uma cDNA ligado em ligante EcoRI.

O cDNA ligado ao ligante EcoRI foi tratado com EcoRI e submetido à cromatografia de coluna CL-4B Sepharose para remover os ligantes residuais. cDNA ligado em ligante EcoRI foi inserido
 10 no sítio EcoRI de λgt11 (Amersham, USA). λGT11 assim obtido foi submetido ao empacotamento *in vitro* usando kit de empacotamento *in vitro* λ (Amersham Co., USA) *E.coli* Y1088 (ATCC37195) foi transferido com o mesmo para obter uma biblioteca de cDNA de pituitária humana.

15 (Etapa 2) Classificação do gene de cDNA de hormônio do crescimento humano.

Para classificar os clones de hormônio do crescimento humano da biblioteca de cDNA preparada na Etapa 1, a hibridização foi conduzida como se segue.

20 Com base na sequência de aminoácido reportada para o terminal N do hormônio do crescimento humano (Liu, W.K. e outros, Biochem. Biophys. Acta., 93, 428 (1964); Li, C.H. e outros, J. Amer. Chem. Soc., 88, 2050 (1966)), 30 fragmentos de nucleotídeo da sonda de oligonucleotídeo de sequência mista
 25 representados pela seguinte sequência de nucleotídeo foram designados e sintetizados:

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg (SEQ ID NO: 4)

5'-TTCCCAACCATTCCCTTATCCAGG-3' (SEQ ID NO: 5)

A hibridização da placa primária foi conduzida usando uma sonda de oligonucleotídeo de sequência mista, de acordo com o processo de Benton e outros (Benton, W.E. e outros, Science, 196, 180 (1977)) para obter clones positivos. Estes clones foram submetidos a hibridizações de placa secundária e terciária para obter um clone possuindo gene cDNA de hormônio do crescimento humano.

Para confirmar que o clone possui o gene do hormônio do crescimento humano, DNA de fago clonado foi clivado com EcoRI e então os fragmentos de DNA foram submetidos ao Manchamento Southern (Southern, E., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)) usando a sonda de oligonucleotídeo de sequência mista. Adicionalmente, um fragmento de EcoRI de 0,65 kb contendo o gene de hormônio do crescimento humano foi inserido no sítio de EcoRI do vetor M13mp18 (Pharmacia, USA) para obter o vetor M13-hGH. A sequência de nucleotídeo do gene de hormônio do crescimento humano do vetor M13-hgH foi determinada usando o processo de terminação de cadeia mediado por dideoxi (Sanger, F. e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 54-63-5467 (1977)).

Exemplo de Preparação 2: Preparação do Hormônio de Crescimento Humano Maduro Codificando o Gene A

Para preparar um hormônio de crescimento humano maduro codificando o gene cDNA, o vetor M13-hGH obtido na Etapa 2 do Exemplo de Precipitação 1 foi submetido a PCR usando os primers que se seguem S1 e AS1. O primer de sentido S1 foi designado para prover um sítio de restrição NdeI

(5'-CATATG-3') a montante do códon para o primeiro aminoácido (fenilalanina) do hormônio de crescimento humano maduro e o primer de sentido contrário AS1, para prover um sítio de restrição BamHI (5'-GGATCC-3') a jusante do códon de terminação do mesmo.

primer de sentido S1 (SEQ ID NO: 6):

5'-CCGCATATGTTCCCAACCATTCCC-3'

primer de sentido contrário AS1 (SEQ ID NO: 7):

5'-GCTGGATCCTAGAAGCCACAGCTGC-3'

O gene do hormônio do crescimento humano ampliado foi clivado com NdeI e BamHI para obter um hormônio do crescimento humano maduro codificando o gene (designado gene hGH). O gene hGH foi inserido na seção NdeI/BamHI do vetor pET14b(Movagen, USA) para obter o vetor pT-hGH.

A figura 1 mostra o procedimento acima para construção do vetor pT-hGH.

Exemplo de Preparação 3: Construção do vetor contendo um gene codificando proteína de fusão hGH/peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E. coli*

(Etapa 1) Clonagem do gene de peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli*

Para preparar o gene de peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli*, o par que se segue de oligonucleotídeos complementares foi designado com base na sequência de nucleotídeo do peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli* e sintetizado usando sintetizador de DNA (Modelo 380B, Applied Biosystem, USA).

Oligonucleotídeo STII S1 de fita de sentido (SEQ ID NO: 8)

5' TCATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTATT
GCTACAAATGCCTACGCGT-3'

oligonucleotídeo STII AS1 de fita de anti-sentido (SEQ
5 ID NO: 9)

5' ACGCGTAGGCATTTGTAGCAATAGAAAAACGAACATAGATGCAAGAAGAAAT
GCGATATTCTTTTTCATGA-3'

Os oligonucleotídeos foram designados para possuir
sítios de restrição NcoI e BspHI a montante do códon de iniciação
10 da enterotoxina II de *E.coli* e um sítio de restrição MluI
introduzido por uma alteração silenciosa na outra extremidade.

Ambos os oligonucleotídeos foram temperados a 95°C para
obter fragmentos de ds DNA de terminação cega possuindo uma
seqüência de nucleotídeo codificando o peptídeo sinalizador de
15 enterotoxina II de *E.coli* (gene STII).

O gene STII foi inserido no sítio SmaI do vetor pUC19
(Biolabs, USA) para obter o vetor pUC19ST.

(Etapa 2) Preparação de um gene codificando a proteína
de fusão STII/hGH

20 Para preparar um gene de codificação de proteína de
fusão STII/hGH, o vetor pT-hGH obtido no Exemplo de Preparação 2
foi submetido a PCR usando os primers S2 E AS1 usados no Exemplo
de Preparação 2. O primer de sentido S2 foi projetado para prover
um sítio de restrição MluI (5'-CARATG-3') a montante do códon para
25 o primeiro aminoácido (fenilalanina) do hormônio de crescimento
humano maduro.

primer de sentido S2 (SEQ ID NO: 10)

5'-GCGACGCGTTCCCAACCATTCCTTATCC-3'

Os fragmentos de DNA ampliados foram clivados com MluI e BamHI e então inseridos na seção MluI/BamHI do pUC19ST obtido na
 5 Etapa 2. O vetor Puc19SH assim obtido continha um gene codificando uma proteína de fusão STII/hGH (designada gene STII-hGH).

A figura 2 ilustra o procedimento acima para construção dos vetores pUC19ST e pUC19SH.

(Etapa 3) Adição da sequência Shine-Delgarno da
 10 enterotoxina II de E.coli ao gene STII-hGH

O vetor pUC19SH obtido na Etapa 2 foi clivado com BspHI e BamHI para obter um fragmento STII-hGH de 640 pares de base, que foi inserido em uma seção NcoII/BamHI do vetor pET14b (Novagem, USA) para obter o vetor pT14SH.

15 O vetor pT14SH foi submetido a PCR usando primers S3 e AS3. O primer de sentido S3 foi projetado para prover uma sequência Shine-Dalgarno de enterotoxina II de E.coli (designada sequência STII SD) e um sítio de restrição XbaI e o primer de sentido contrário AS3, para proverem um sítio de restrição BamHI a
 20 jusante do códon de terminação de hGH maduro para obter um fragmento de DNA (STII SD-hGH) contendo um gene de fusão STII SD e STII-hGH.

primer de sentido S3 (SEQ ID NO: 11)

5'-GCTCTAGAFFTTGAGGTGATTTTATGAAAAAGAATA-3'

25 primer de anti-sentido AS3 (SEQ ID No: 12)

5'-GGATGCCACGCTGGATCCTAGAAAGCCACAGCTG-3'

O fragmento STII SD-STII-hGH foi clivado com XbaI e BamHI e então inserido na seção XbaI/BamHI do vetor pET14b (Movagen, USA) para obter o vetor pT14SSH. *E.coli* BL21 (DE3) (Stratagene, USA) foi transformado com o vetor pT14SSH para
5 obter um transformante designado *E.coli* HM10010.

A figura 3 representa o procedimento acima para o vetor de construção pT14SSH.

Exemplo de Preparação 4: Produção de hGH usando o gene STII-hGH

10 Para examinar o efeito da sequência SD de enterotoxina II de *E.coli* na produção de hGH, *E.coli* BL21 (DE3) transformado com o vetor pT14SH obtido na Etapa 3 do Exemplo de Preparação 3 e *E.coli* HM10010 obtido também na Etapa 3 do Exemplo de Preparação 3 foram cultivados em presença e au-
15 sência de um indutor de expressão (IPTG), respectivamente, no meio LB (1% bacto-triptona, 0,5% de extrato de bacto-levedura e 1% de NaCl) a 37°C por 24 horas. Cada uma das culturas foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos para precipitar a célula bacteriana e o precipitado foi suspenso
20 em um volume 1/10 de solução isotônica (20% de sacarose, 10 mM de solução de tampão Tris-Cl contendo 1 mM de EDTA, pH 7,0). A suspensão foi deixada descansar em temperatura ambiente por 30 minutos e então centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos para coletar células bacterianas. As células foram
25 ressuspensas em água destilada a 4°C e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos para obter um sobrenadante como uma solução periplásmica. O nível de hGH na solução periplásmica foi analisado de acordo com o processo ELISA (Kato,

K. e outros, J. Immunol, 116, 1554 (1976)) usando um anticorpo contra hGH (Boehringer Mannheim), que foi calculado como a quantidade de hGH produzida por 1 litro de cultura. Os resultados são mostrados na Tabela I.

5

TABELA I

	PT14SH		PT14SSH	
IPTG	-	+	-	+
Nível hGH (mg/l)	120	100	330	250

Exemplos 1 a 10

Exemplos 1 a 10 descrevem a construção de vetores, cada um contendo um gene codificando uma proteína de fusão MST/hGH de acordo com a presente invenção, onde MST representa o peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E.coli* modificado. O gene STII ou sequência STII SD de plasmídeo pT14SSH obtido na Etapa 3 do Exemplo de Preparação 3 foi modificado de acordo com a mutagnese direcionada ao sítio (Papworth, C. e outros, Strategies, 9, 3 (1996)) que foi conduzida por PCR do plasmídeo com um primer de sentido possuindo uma sequência de nucleotídeo modificada e um primer de sentido contrário possuindo uma sequência de nucleotídeo complementar ao primer de sentido.

Os peptídeos sinalizadores de enterotoxina II de *E.coli* obtidos nos Exemplos 1 a 10, MSTs (MST1 a MST10) são caracterizados na Tabela II em conjunto com STII, e o procedimento preparativo dos Exemplos 1 a 10 é descrito a seguir.

Tabela II

Exemplo	MST	2°	4°	5°	12°	20°	22°

	STII (SEQ ID NO: 1)	Lys	Asn	Ile	Met	Asn	Tyr
1	MST1 (SEQ ID NO: 13)	Lys	Thr	Ile	Met	Asn	Gln
2	MST2 (SEQ ID NO: 14)	Lys	Thr	Ile	Met	Val	Gln
3	MST3 (SEQ ID NO: 15)	Lys	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
4	MST4 (SEQ ID NO: 16)	Lys	Ser	Ile	Met	Asn	Gln
5	MST5 (SEQ ID NO: 17)	Lys	Ser	Ile	Met	Val	Gln
6	MST6 (SEQ ID NO: 18)	Lys	Thr	Ile	Gly	Val	Gln
7	MST7 (SEQ ID NO: 19)	Lys	Thr	Ile	Leu	Val	Gln
8	MST8 (SEQ ID NO: 20)	Lys	Lys	Ser	Met	Asn	Gln
9	MST9 (SEQ ID NO: 21)	Val	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
10	MST10 (SEQ ID NO: 22)	Lys	Lys	Ile	Met	Val	Gln

Exemplo 1: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando Proteína de Fusão MST1/hGH

(Etapa 1)

O vetor pT14SSH obtido na Etapa 3 do Exemplo de
 5 Preparação 3 foi submetido a PCR usando os seguintes primers complementares S4 le AS4 que foram projetados para substituir o códon Thr (ACA) para o quarto códon (AAT) de STII.

primer de sentido S4 (SEQ ID NO: 23):

5'-GGTGTTTTATGAAAAAGACAATCGCATTTCTTC-3'

primer de sentido contrário AS4 (SEQ ID NO:24):

5'-GAAGAAATGCGATTGTCTTTTTCATAAACACC-3'

5 O vetor assim obtido foi clivado com XbaI e MluI para obter um fragmento de 0,1 kb de XbaI/MluI, que foi inserido na seção XbaI/MluI do vetor pT14SSH para obter o vetor pT14SSH-4T. O vetor pT14SSH-4T contém um gene codificando uma proteína de fusão STII/hGH modificada
10 possuindo Thr no lugar do quarto aminoácido de STII.

(Etapa 2)

O vetor pT14SSH-4T foi submetido a PCR utilizando os primers complementares que se seguem S5 e AS5 que foram projetados para substituir códon Gln (CAA) para o vigésimo
15 segundo códon (TAT) de STII, para obter o valor pT14SSH-4T22Q.

primer de sentido S5 (SEQ ID NO: 25):

5'-CAAATGCCCAAGCGTTCCCA-3'

primer de sentido contrário AS5(SEQ ID NO: 26):

5'-TGGGAACGCTTGGGCATTTG-3'

20 O vetor pT14SSH-4T22Q continha um gene codificando Proteína MSTI/Hgh de fusão onde o quarto e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Thr e Gln, respectivamente.

(Etapa 3)

25 O vetor pT14SSH-4T22Q foi submetido a PCR empregando os primers complementares que se seguem S6 e AS6 possuindo as seis seqüências de nucleotídeo mostradas abaixo

entre a sequência STII SD 5'-GAGG-3' e o códon de iniciação de STII a fim de prevenir a formação de estruturas secundárias de mRNA transcritas das mesmas.

Primer de sentido S6 (SEQ ID NO: 27):

5 5'-TCTAGAGGTTGAGGTGTTTTATGA-3'

primer de anti-sentido AS6 (SEQ ID NO: 28):

5'-TCATAAAACACCTCAACCTCTAGA-3'

O vetor pT14S1SH-4T22Q assim obtido continha a sequência modificada STII SD e um gene codificando a proteína
10 MST1/Hgh de fusão onde o quarto e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Thr e Gln, respectivamente.

A figura 4 mostra o procedimento acima para o vetor de construção pT14S1SH.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor
15 pT14S1SH4T22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10011, que foi depositado no Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) em 12 de agosto 1998 sob o número de acesso KCCM-10137.

Exemplo 2: Construção do Vetor Contendo um Gene
20 Codificando Proteína de Fusão MST2/hGH

O procedimento da etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido exceto pelo emprego dos primers complementares que se seguem S7 e AS7 que foram projetados para substituir códons Val e Gln (GTT e CAA) para o vigésimo e vigésimo segundo códons (AAT e TAT) de
25 STII, respectivamente, para obter o vetor pT14SSH-4T2Q.

primer de sentido S7 (SEQ ID NO: 29):

5'-GTTTTTCTATTGCTACAGTTGCCCCAAGCGTTCCCAACCATTTCCC-3'

primer de anti-sentido AS7 (SEQ ID NO: 30):

5'-GGGAATGGTTGGGAACGCTTGGGCAACTGTAGCAATAGAAAAAAC-3'

Então, o procedimento da etapa 3 do Exemplo 1 foi repetido exceto pelo emprego do vetor pT14SSH-4T20V22Q, para obter o vetor pT14SISH-4T20V22Q. O vetor pT14SISH-4V20V22Q continha uma sequência modificada STII SD e um gene codificante proteína de fusão MST3/hGH onde o quarto, vigésimo e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Thy, Val e Gln, respectivamente.

E. Coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT14SISH4T20V22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10012, que foi depositado no KCCM em 12 de agosto de 1998 sob o número de acesso KCCM-10138.

Exemplo 3: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando Proteína de Fusão MST3/hGH

O procedimento da etapa 1 do Exemplo 1 foi repetido exceto pelo emprego dos primers complementares que se seguem S8 e AS8, que foram projetados para substituir códons Lys e Thr códons (AAG e ACA) para o quarto e quinto códons (AAT e ATC) de STII, respectivamente, para obter o vetor pT14SSH-4K5T.

primer de sentido S8 (SEQ ID NO: 31):

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGAAGACAGCATTTCTTC-3'

primer anti-sentido AS8 (SEQ ID NO: 32):

5'-GAAGAAATGCTGTCTTCTTTTCATAAACACCTC-3'

Utilizando o vetor pT14SSH-4kst, o procedimento da etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido para obter o vetor pT14SSH4K5T22Q.

Então, o procedimento da etapa 3 do Exemplo 1 foi repetido utilizando o vetor pT14SSH-4K5T22Q, para obter o vetor pT14S1SH4KST22Q. O vetor pT14S1SH-4K5T22Q continha a sequência modificada STII SD e um gene codificando a proteína de fusão MST3/Hgh onde o quarto, quinto e vigésimo segundo do aminoácidos de STII foram substituídos por Lys, Thr e Gln, respectivamente.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT4S1SH4K5T22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10013.

Exemplo 4: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando a Proteína de Fusão MST4/hGH

O procedimento da etapa 1 do Exemplo 1 foi repetido exceto pelo emprego dos primers complementares que se seguem S9 e AS9 que foram projetados para substituir o códon Ser (TCT) para o quarto códon (AAT) de STII, para obter o vetor pT14SSH-4S, o procedimento da etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido para obter o vetor pT14SSH-4S22Q.

primers de sentido S9 (SEQ ID NO: 33)

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGRCTATCGCATTTCTTC-3'

primers de anti-sentido AS9 (SEQ ID NO: 34)

5'-GAAGAAATGCGATAGACTTTTTTCATAAACACCTC-3'

Utilizando o vetor pT14SSH-4S, o procedimento da etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido para obter o vetor pT14SSH-4S22Q.

Então, o procedimento da etapa 3 do Exemplo 1 foi repetido utilizando o vetor pT14SSH-4S22Q, para obter o vetor pT14S1SH-4S22Q. O vetor pT14S1SH-4S22Q continha a sequência modificada STII SD e um gene codificando a proteína de fusão MST4/hGH, onde o quarto e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Ser e Gln, respectivamente.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT14S1SH4S22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10014.

10 Exemplo 5: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando a Proteína de Fusão MST5/hGH

O procedimento da etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido exceto pelo emprego do vetor pT14SSH-4S obtido no Exemplo 4 e os primers S7 e AS7 como usados no Exemplo 2, para obter o vetor
15 pT14SSH-4S2OV22Q.

Então, o procedimento da etapa 3 do exemplo 1 foi repetido utilizando o vetor pT14SSH-4S2OV22Q, para obter o vetor pT14S1SH-4S2OV22Q. O vetor pT14S1SH-4S2OV22Q continha a sequência modificada STII SD e um gene codificando a proteína de fusão
20 MST5/Hgh onde o quarto, vigésimo e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Ser, Val e Gln, respectivamente.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT14S1SH-4S2OV22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10015.

25 Exemplo 6: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando Proteína de Fusão MST6/hGH

O vetor pT14SSH-4T20V22Q obtido no Exemplo 2 foi submetido a PCR utilizando os primers complementares que se seguem S10 e AS10 que foram designados para substituir o código Gly (ggt) para o décimo segundo códon (ATG) de STII, para obter o vetor
5 pT14SSH-4T12G20V22Q.

primer de sentido S10 (SEQ ID NO: 35):

5'-GCATTTCTTCTTGCACTCTGGTTTCGTTTTTCTATTGC-3'

primer de anti-sentido AS10 (SEQ ID NO: 36):

5'-GCAATAGAAAAACGAAACCAGATGCAAGAAGAAATGC-3'

10 Então, o procedimento da etapa 3 do Exemplo 1 foi repetido utilizando o vetor pT14SSH-4T12G20V22Q, para obter o vetor pT14S1SH-4T12G20V22Q. O vetor pT14S1SH-4T12G20V22Q continha uma sequência modificada STII SD e um gene codificando a proteína de fusão MST6/hGH, onde o quarto, décimo segundo, vigésimo e
15 vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Thr, Gly, Val e Gln, respectivamente.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT14S1SH-4T12G20V22Q para obter um transformante denominado E. coli HM10016.

20 Exemplo 7: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando a Proteína de Fusão MST7/Hgh

O vetor pT14SSH-4T12G20V22Q obtido no Exemplo 6 foi submetido a PCR utilizando os primers complementares que se seguem S11 e AS11 que foram designados para substituir o códon Leu (CTT) para o décimo segundo códon (GGT) de MST6, para obter o vetor
25 pT14SSH-4T12L20V22Q.

primer de sentido S11 (SEQ ID NO: 37):

5'-GCATTTCTTCTTGCACTCTTTTCGTTTTTCTATTGC-3'

primer de anti-sentido AS11 (SEQ ID NO: 38):

5'-GCAATAGAAAAACGAAAAGAGATGCAAGAAGAAATGC-3'

Então, o procedimento da etapa 3 do Exemplo 1 foi repetido utilizando o vetor pT14SSH-4T12L2OV22Q, para obter o
vetor pT14S1SH-4T12L2OV22Q. O vetor pT14S1SH-4T12L2OV22Q continha
uma sequência modificada STII SD e um gene codificando a proteína
de fusão MST7/hGH, onde o quarto, décimo segundo, vigésimo e
vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Thr,
Leu, Val e Gln, respectivamente.

E. coli BL21(DE3) foi transformado com o vetor
pT14S1SH-4T12L2OV22Q para obter um transformante denominado *E.*
coli HM10017.

Exemplo 8: Construção do Vetor Contendo um Gene
Codificando a Proteína de Fusão MST8/hGH

O procedimento da etapa 1 do Exemplo 1 foi repetido
exceto pelo emprego dos primers complementares que se seguem S12 e
AS12 que foram projetados para substituir os códigos Lys e ser
(AAG e TCT) para o quarto e quinto códons (AAT e ATC) de STII,
respectivamente, para obter o vetor pT14SSH-4K5S.

primers de sentido S12 (SEQ ID NO: 39):

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAGAAGTCTGCATTTCTTC-3'

primers de anti-sentido AS12 (SEQ ID NO: 40):

5'-GAAGAAATGCAGACTTCTTTTTCATAAAACACCTC-3'

Utilizando o vetor pT14SSH-4K5S, o procedimento da
etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido para obter o vetor
pT14SSH-4KSS22Q. O vetor pT14SSH-4K5S22Q continha um gene
codificando a proteína de fusão MST8/hGH, onde o quarto,

quinto e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Lys, Ser e Gln, respectivamente.

E. coli BL21(DE3) foi transformado com o vetor pT14SSH-4K5S22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10018.

5 Exemplo 9: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando a Proteína de Fusão MST9/hGH

O procedimento da Etapa 1 do Exemplo 1 foi repetido, exceto pelo emprego dos primers complementares que se seguem S13 e AS13 que foram projetados para substituir os códons Val, Lys e Thr
10 códons (GTT, AAG e ACA) para o segundo, quarto e quinto códons (AAA, AAT e ATC) de STII, respectivamente, para obter o vetor pT14SSH-2V4K5T.

primer de sentido S13 (SEQ ID NO: 41):

5'-GAGGTGTTTTATGGTTAAGAAGACAGCATTTCTTC-3'

15 primers de anti-sentido AS13 (SEQ ID NO: 42):

5'-GAAGAAATGCTGTCTTCTTAACCATAAAACACCTC-3

Utilizando o vetor pT14SSH-2V4K5T, o procedimento da etapa 2 do Exemplo 1 foi repetido para obter o vetor pT14SSH-2V4K5T22Q. O vetor pT14SSH-2V4K5T22Q continha um gene codificando
20 a proteína de fusão MST9/hGH, na qual o segundo, quarto, quinto e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Val, Lys, Thr e Gln, respectivamente.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT14SSH-2V4k5T22Q para obter um transformante denominado *E. Coli*
25 HM10019.

Exemplo 10: Construção do Vetor Contendo um Gene Codificando a Proteína de Fusão MST10/hGH

O procedimento da etapa 1 do Exemplo 1 foi repetido exceto pelo emprego dos primers complementares que se seguem S14 e AS14 que foram projetados para substituir o códon Lys (AAG) para o quarto códon (AAT) de STII, para obter o vetor pT14SSH-4K.

5 Primer de sentido S14 (SEQ ID NO: 43):

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGAAGATCGCATTTCTTC-3'

 primer de sentido contrário AS14 (SEQ id no: 44):

5'-GAAGAAATGCGATCTTCTTTTTCATAAAACACCTC-3'

 Utilizando o vetor pT14SSH-4K, o procedimento da etapa
10 2 do Exemplo 1 foi repetido para obter o vetor pT14SSH-4K22Q.

O vetor pT14SSH-4K22Q foi submetido a PCR utilizando os primers S7 e AS7 empregados no Exemplo 2 para obter o vetor pT14SSH-4K20V22Q. O vetor pT14SSH-4K20V22Q continha um gene codificando a proteína de fusão MST10/hGH, onde o quarto, vigésimo
15 e vigésimo segundo aminoácidos de STII foram substituídos por Lys, Val e Gln, respectivamente.

E. coli BL21 (DE3) foi transformado com o vetor pT14-9SH4K20V22Q para obter um transformante denominado *E. coli* HM10020.

20 Exemplo 11: Produção de hGH usando o Gene MST/Hgh

Para examinar o efeito de MST na produção de hGH, o procedimento de Preparação do Exemplo 4 foi repetido usando os transformantes (*E. coli* HM10011 a HM10020) preparados nos Exemplos 1 a 10, na ausência de IPTG adicionado. O
25 transformante HM10010 preparado na Etapa 3 do Exemplo de Preparação 3 foi usado como um controle. O nível de hGH foi

calculado como a quantidade de hGH produzida por 1 litro de meio de cultura. Os resultados são mostrados na Tabela III.

TABELA III

Transformante	Vetor de Expressão	Nível hGH (mg/l)
<i>E.coli</i> HM10010	p14SSH	330
<i>E.coli</i> HM10012	pT14S1SH-4T20V22Q	1.300
<i>E.coli</i> HM10013	pT14S1SH-4K5T22Q	1.270
<i>E.coli</i> HM10014	pT14S1SH-3S22Q	1.320
<i>E.coli</i> HM10015	pT14S1SH-4S20V22Q	1.230
<i>E.coli</i> HM10016	pT14S1SH-4T12G20V22Q	1.173
<i>E.coli</i> HM10017	pT14S1SH-4T12L20V22Q	1.282
<i>E.coli</i> HM10018	pt14ssh-4K5S22Q	1.150
<i>E.coli</i> HM10019	pT14SSH-2V4K5T22Q	1.140
<i>E.coli</i> HM10020	pT14SSH-4K20V22Q	1.230

Conforme pode ser visto da Tabela III, cada um dos
 5 vetores da presente invenção contendo um gene MST produz hGH em um rendimento superior ao do vetor de controle p14SSH contendo STII nativo. Adicionalmente, entre os vetores da presente invenção, aqueles contendo seqüências STII SD modificadas conduzem a um nível alto de hGH, quando comparados
 10 aos vetores contendo a seqüência STII SD nativa.

Exemplo 12: Purificação de hGH

O transformante de *E.coli* HM10011 preparado no Exemplo 1, foi cultivado em meio LB, enquanto a expressão do gene MST/hGH foi induzida usando IPTG, e a cultura foi cen-
 15 trifugada a 6.000 rpm por 20 minutos para colher as células. A solução periplásmica foi preparada das células, repetindo-se o procedimento do Exemplo de Preparação 4.

A solução periplásmica foi ajustada para pH 5,3 a 6,0 adsorvida em coluna DEAE-Sepharose (Pharmacia Inc., Suécia) pré-equilibrada para pH 5,8 e, então, a coluna foi lavada com solução de 10 mM de NaCl. hGH foi eluído usando soluções tampão contendo
5 20 mM, 40 mM e 80 mM de NaCl, respectivamente, e frações contendo hGH coletadas e combinadas.

As frações combinadas foram submetidas a cromatografia de coluna de Fenil Sepharose (Pharmacia Inc., Suécia) para obter hGH possuindo uma pureza de 99%, que foi adicionalmente purificada
10 por cromatografia de coluna Sephadex G-100 (Pharmacia Inc., Suécia).

A fração de hGH purificada foi submetida a eletroforese de gel de poliacrilamida dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE) para determinar a pureza e concentração aproximada de hGH, e então
15 submetida ao ELISA para determinar a concentração exata de hGH nesta fração.

A figura 5 reporduz o resultado de SDS-PAGE, onde a prancha 1 mostra as proteínas marcadoras de tamanho de proteína e a prancha 2, o hGH purificado. Conforme pode ser visto na figura
20 5, o alto nível de hGH puro é obtido por cultivo do transformante da presente invenção.

Adicionalmente, a sequência de aminoácido de terminal N de hGH foi determinada e o resultado mostra que o hGH produzido de acordo com a invenção não é metionilado no terminal N.

25 Embora a invenção tenha sido descrita com relação às concretizações específicas acima, deve ser reconhecido que várias modificações e alterações podem ser feitas à in-

venção, pelos versados na técnica, as quais encontram-se dentro do escopo da invenção, conforme definido pelas reivindicações apenas.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo sinalizador de enterotoxina II de E.coli modificado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um dos segundo, quarto, quinto, décimo segundo, vigésimo e
5 vigésimo segundo aminoácidos de peptídeo sinalizador de enterotoxina II de E. coli tendo a sequência de aminoácidos Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala (SEQ ID: 1) é substituído como segue:

10 o segundo aminoácido Lys não é substituído ou é substituído por Val;

 o quarto aminoácido Asn é substituído por Ser, Thr ou Lys;

15 o quinto aminoácido Ile não é substituído ou é substituído por Thr ou Ser;

 o décimo segundo aminoácido Met não é substituído ou é substituído por Gly ou Leu;

 o vigésimo aminoácido Asn não é substituído ou é substituído por Val; e

20 o vigésimo segundo aminoácido Tyr é substituído por Gln.

2. Peptídeo sinalizador de enterotoxina II de E. coli (SEQ ID: 1) modificado de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que possui um dos conjuntos que
25 se seguem de substituições de aminoácido:

 (a) o quarto Asn por Thr e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 13);

(b) o quarto Asn por Thr, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 14);

(C) o quarto Asn por Lys, o quinto Ile por Thr e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 15);

5 (d) o quarto Asn por Ser e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 16);

(e) o quarto Asn por Ser, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 17);

10 (f) o quarto Asn por Thr, o décimo segundo Met por Gly, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 18);

(g) o quarto Asn por Thr, o décimo segundo Met por Leu, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 19);

15 (h) o quarto Asn por Lys, o quinto Ile por Ser e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 20);

(i) o segundo Lys por Val, o quarto Asn por Lys, o quinto Ile por Thr e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 21); e

20 (k) o quarto Asn por Lys, o vigésimo Asn por Val e o vigésimo segundo Tyr por Gln (SEQ ID: 22).

3. Gene **CHARACTERIZADO** pelo fato de que codifica o peptídeo sinalizador de enterotoxina II de E.coli (SEQ ID: 1) modificado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que os genes estão representados pelas SEQ ID: 25 nos 46 a 55.

4. Vetor de expressão **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o gene como definido na reivindicação 3, fundido com um gene codificando uma proteína heteróloga.

5. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína heteróloga é hormônio do crescimento humano.

6. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma sequência de Shine-Dalgarno de enterotoxina II de E.coli modificada da seguinte sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 2), inserida imediatamente antes do início do códon do gene da reivindicação 3:

5'-GAGGTGTTTT-3' (SEQ ID NO: 2).

7. Microorganismo **CARACTERIZADO** pelo fato de que é transformado com o vetor de expressão conforme definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 6.

8. Microorganismo de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é um E.coli transformado.

9. Microorganismo de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o E.coli transformado é E.coli HM10011 (KCCM-10137) ou E.coli MH10012 (KCCM-10138).

10. Processo para produção de uma proteína heteróloga no microorganismo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o cultivo de microorganismo transformado conforme definido na reivindicação 7, para produzir e secretar a proteína heteróloga para o periplasma; e recuperar a proteína heteróloga do periplasma.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o microorganismo transformado é E.coli HM10011 (KCCM-10137) ou E.coli MH10012 (KCCM-10138).

5 12. Processo de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína heteróloga é hormônio do crescimento humano.

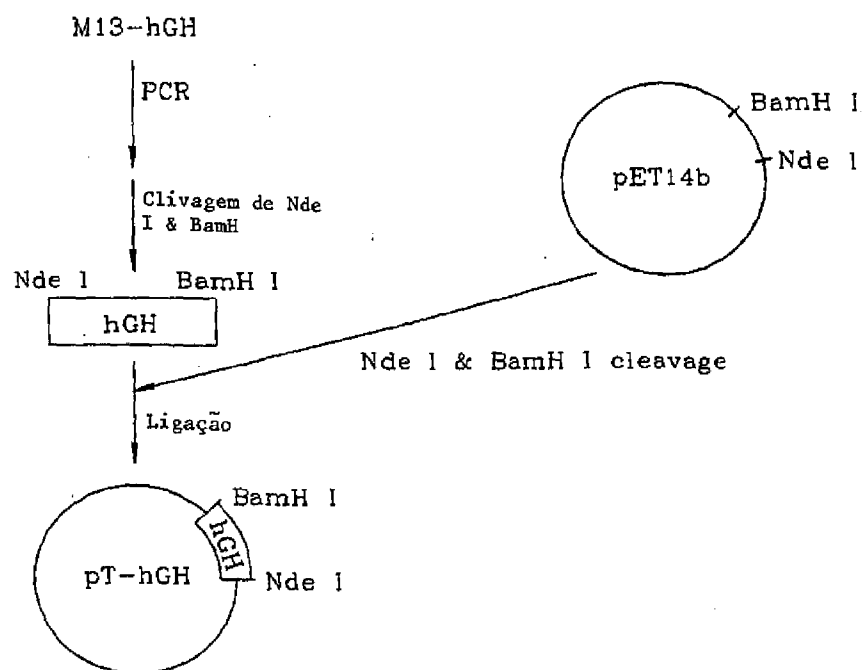
FIG. 1

FIG.2

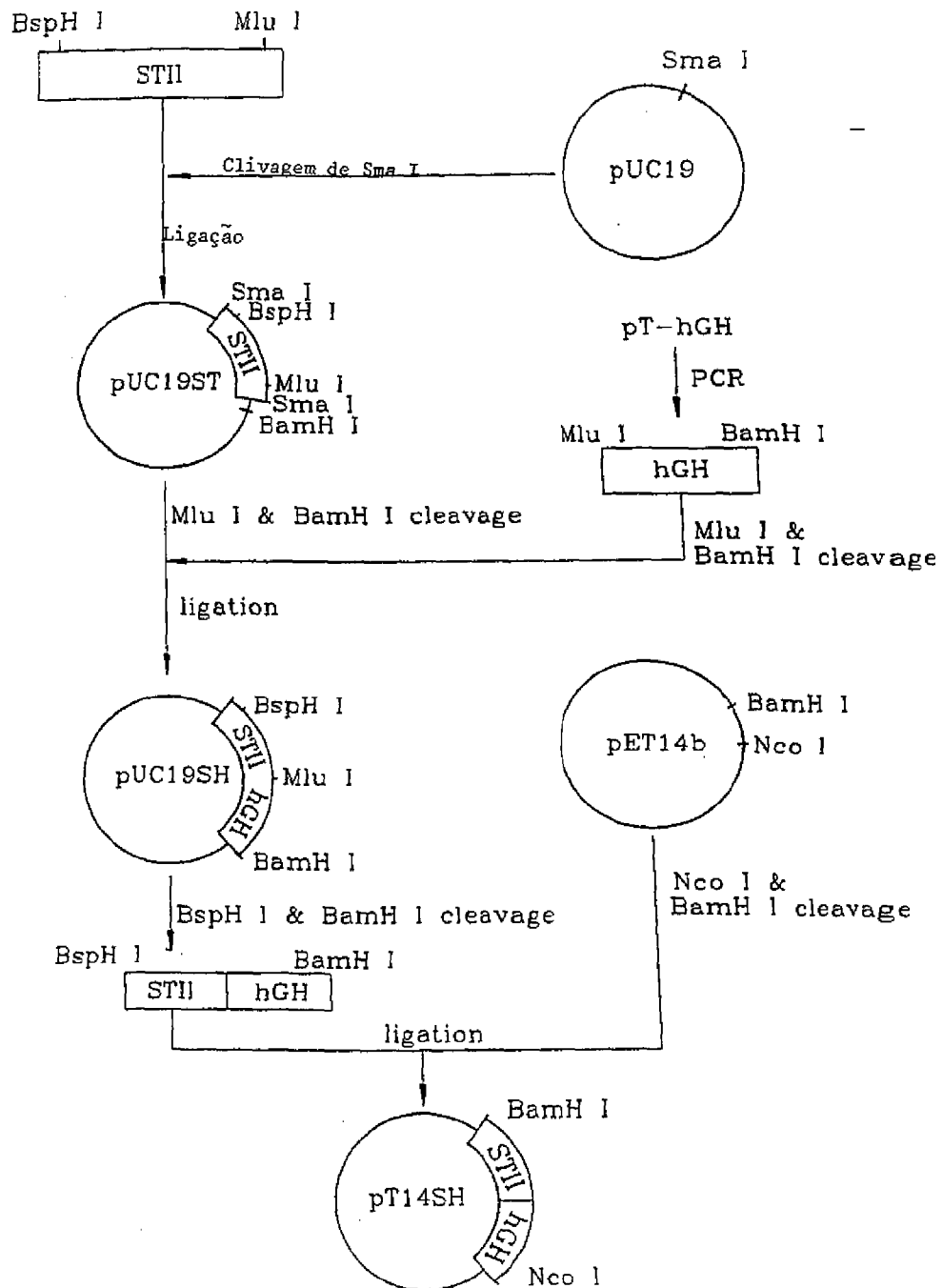


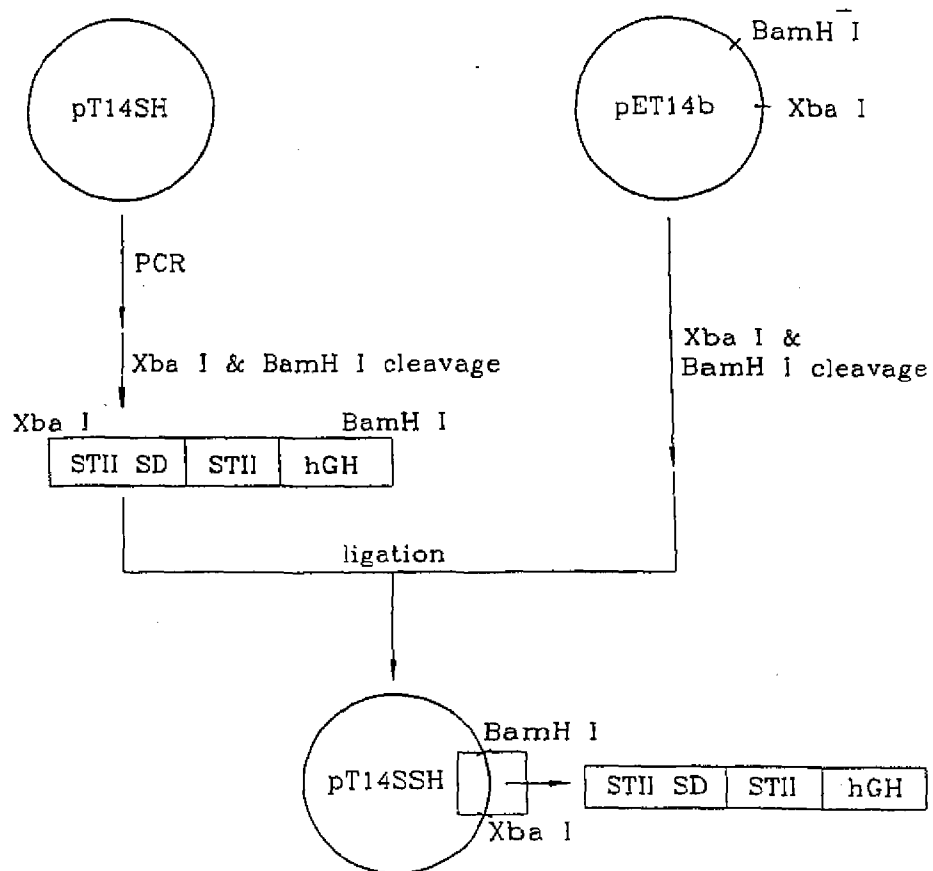
FIG. 3

FIG. 4

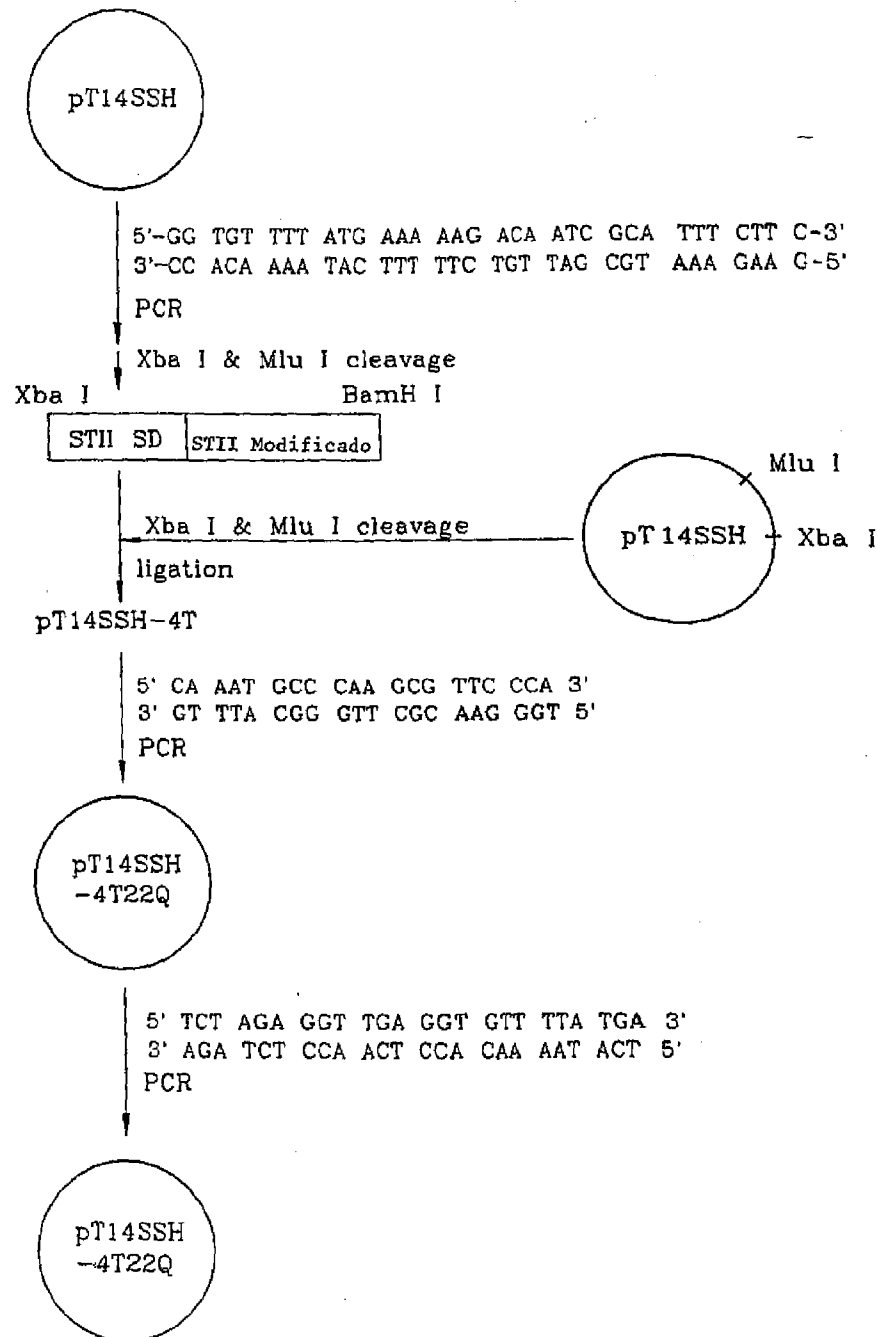


FIG. 5

RESUMO

"PEPTÍDEO SINALIZADOR DE ENTEROTOXINA II DE *E. COLI* MODIFICADO E UM MICROORGANISMO EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE FUSÃO DO PEPTÍDEO E UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA"

5 Uma proteína heteróloga é produzida por: (i) cultivo de um microorganismo transformado com um vetor de expressão compreendendo um gene codificando um peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E. coli* modificado, fundido à proteína heteróloga para produzir e secretar a proteína he-
10 teróloga para periplasma, o peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E. coli* modificado é obtido por substituição de pelo menos um dos segundo, quarto, quinto, décimo segundo, vigésimo e vigésimo segundo aminoácidos do peptídeo sinalizador de enterotoxina II de *E. coli* da seguinte seqüência de
15 aminoácido (SEQ ID NO: 1) com outro aminoácido, contanto que, pelo menos um dos segundo e quarto aminoácidos do peptídeo modificado seja lisina; e (ii) recuperando a proteína heteróloga do periplasma.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



6B97A402BDD02513

Campo 2



60D430086AEA1791

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 146889.txt
- Data de Geração do Código: 11-03-2011
- Hora de Geração do Código: 15:45:28
- Código de Controle:
 - Campo 1: 6B97A402BDD02513
 - Campo 2: 60D430086AEA1791

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> HANMI PHARM. CO. LTD.

<120> PEPTÍDEO SINALIZADOR DE ENTEROTOXINA II DE E.COLI MODIFICADO E UM MICROORGANISMO

EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA DE FUSÃO DO PEPTÍDEO E UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA

<130> PC90930/HMY/PCT

<140> PI99136988

<141> 15/09/1999

<150> KR1998-38061

<151> 15/09/1998

<160> 55

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(22)

<223> Peptídeo sinalizador de enterotoxina II de E. coli

<400> 1

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1

5

10

15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

20

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> RBS

<222> (1)..(10)
 <223> sequência shine-dalgano de enterotoxina II de E. coli modificada

<400> 2
 gaggtgtttt 10

<210> 3
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> RBS
 <222> (1)..(35)
 <223> sequência shine-delgano de enterotoxina II de E. coli

<400> 3
 gctctagagg ttgaggtgtt ttatgaaaaa gaata 35

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223> uma porção N-terminal do hormônio do crescimento humano

<400> 4
 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> sonda de oligonucleotídeo sintetizado com base na sequência de aminoácido para

a porção N-terminal de hormônio de crescimento humano

<400>	5		
		ttcccaacca ttcccttata cagg	24
<210>	6		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	sequência artificial		
<220>			
<223>	primer senso S1		
<400>	6		
		ccgcataatgt tcccaaccat tccc	24
<210>	7		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	sequência artificial		
<220>			
<223>	primer anti-senso AS1		
<400>	7		
		gctggatcct agaagccaca gctgc	25
<210>	8		
<211>	72		
<212>	DNA		
<213>	sequência artificial		
<220>			
<223>	fita de oligonucleotídeo senso STII S1		
<400>	8		
		tcatgaaaaa gaatatcgca tttcttcttg catctatgtt cgttttttct attgctacaa	60
		atgcctacgc gt	72

<210> 9
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> afita de oligonucleotídeo anti-senso STII AS1

<400> 9
 acgcgtaggc attttagca atagaaaaaa cgaacataga tgcaagaaga aatgcgatat 60
 tcttttttcat ga 72

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer senso S2

<400> 10
 gcgacgcggtt cccaaccatt cccttatcc 29

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer senso S3

<400> 11
 gctctagagg ttgaggtgat tttatgaaaa agaata 36

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>

<223> primer anti-senso AS3

<400> 12

ggatgccacg ctggatccta gaaagccaca gctgc

35

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> MST1

<400> 13

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1

5

10

15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala

20

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> MST2

<400> 14

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1

5

10

15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala

20

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> MST3

<400> 15

Met Lys Lys Lys Thr Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
 20

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> MST4

<400> 16

Met Lys Lys Ser Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
 20

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> MST5

<400> 17

Met Lys Lys Ser Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
 20

<210> 18

<211> 23
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST6

<400> 18
 Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
 20

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST7

<400> 19
 Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Leu Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
 20

<210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST8

<400> 20
 Met Lys Lys Lys Ser Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala

20

<210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST9

<400> 21
 Met Lys Lys Lys Thr Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala
 20

<210> 22
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST10

<400> 22
 Met Lys Lys Lys Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Ala Gln Ala
 20

<210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer senso S4

<400> 23

gggtgttttat gaaaaagaca atcgatttc ttc

33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer anti-senso AS4

<400> 24

gaagaaatgc gattgtcttt ttcataaaac acc

33

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer senso S5

<400> 25

caaatgccca agcggtccca

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer anti-senso AS5

<400> 26

tgggaacgct tgggcatttg

20

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer senso S6

<400> 27

tctagaggtt gaggtgtttt atga

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer anti-senso AS6

<400> 28

tcataaaaca cctcaacctc taga

24

<210> 29

<211> 45

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer senso S7

<400> 29

gttttttcta ttgctacagt tgcccaagcg ttcccaacca ttccc

45

<210> 30

<211> 45

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer antisenso AS7

<400> 30

gggaatgggtt gggaacggtt gggcaactgt agcaatagaa aaaac

45

<210> 31
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer senso S8

<400> 31
 gaggtgtttt atgaaaaaga agacagcatt tcttc

35

<210> 32
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer antisenso AS8

<400> 32
 gaagaaatgc tgtcttcttt ttcataaaac acctc

35

<210> 33
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer senso S9

<400> 33
 gaggtgtttt atgaaaaagt ctatcgatt tcttc

35

<210> 34
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> primer anti-senso AS9

<400> 34
gaagaaatgc gatagacttt ttcataaaac acctc 35

<210> 35
<211> 38
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> primer senso S10

<400> 35
gcatttcttc ttgcatctgg ttctgttttt tctattgc 38

<210> 36
<211> 38
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> primer anti-senso AS10

<400> 36
gcaatagaaa aaacgaaacc agatgcaaga agaaatgc 38

<210> 37
<211> 38
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> primer senso S11

<400> 37
gcatttcttc ttgcatctct ttctgttttt tctattgc 38

<210> 38
<211> 38
<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer anti-senso AS11

<400> 38

gcaatagaaa aaacgaaaag agatgcaaga agaaatgc

38

<210> 39

<211> 35

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer senso S12

<400> 39

gaggtgtttt atgaaaaaga agtctgcatt tcttc

35

<210> 40

<211> 35

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer anti-senso AS12

<400> 40

gaagaaatgc agacttcttt ttcataaaac acctc

35

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> primer senso S13

<400> 41

gaggtgtttt atggttaaga agacagcatt tcttc

35

<210> 42
<211> 35
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> primer anti-senso AS13

<400> 42
gaagaaatgc tgtctttctta accataaaac acctc

35

<210> 43
<211> 35
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> primer senso S14

<400> 43
gaggtgtttt atgaaaaaga agatcgcat tcttc

35

<210> 44
<211> 35
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> primer anti-senso AS14

<400> 44
gaagaaatgc gatcttcttt ttcataaaac acctc

35

<210> 45
<211> 69
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> peptídeo sinalizador de enterotoxina II de E.coli

<400> 45
atgaaaaaga atatcgcat tcttcttgca tctatgttg tttttctat tgctacaaat 60

gcctatgcg 69

<210> 46
<211> 69
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> MST1

<400> 46
atgaaaaaga caatcgcat tcttcttgca tctatgttg tttttctat tgctacaaat 60

gccaagcg 69

<210> 47
<211> 69
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> MST2

<400> 47
atgaaaaaga caatcgcat tcttcttgca tctatgttg tttttctat tgctacagt 60

gccaagcg 69

<210> 48
<211> 69
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> MST3

<400> 48
 atgaaaaaga agacagcatt tcttcttgca tctatgtttg ttttttctat tgctacaaat 60
 gcccaagcg 69

<210> 49
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST4

<400> 49
 atgaaaaagt ctatcgcat tcttcttgca tctatgtttg ttttttctat tgctacaaat 60
 gcccaagcg 69

<210> 50
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST5

<400> 50
 atgaaaaagt ctatcgcat tcttcttgca tctatgtttg ttttttctat tgctacagtt 60
 gcccaagcg 69

<210> 51
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST6

<400> 51
 atgaaaaaga caatcgcat tcttcttgca tctgttttg ttttttctat tgctacagtt 60

gccaagcg 69

<210> 52
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST7

<400> 52
 atgaaaaaga caatcgcat tttttttgca ttttttttg ttttttttat tgctacagtt 60

gccaagcg 69

<210> 53
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST8

<400> 53
 atgaaaaaga agtctgcatt tttttttgca ttttttttg ttttttttat tgctacaaat 60

gccaagcg 69

<210> 54
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> MST9

<400> 54
 atgaaaaaga agacagcatt tttttttgca ttttttttg ttttttttat tgctacaaat 60

gccaagcg 69

<210> 55
<211> 69
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> MST10

<400> 55
atgaaaaaga agatcgatt tcttcttgca tctatgttg ttttttctat tgctacagtt 60
gccaagcg 69