

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 94 961

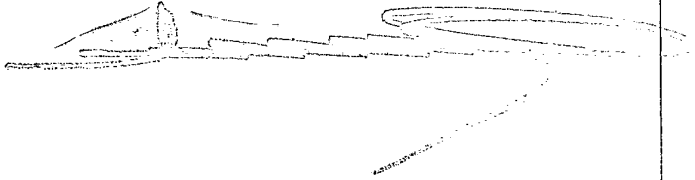
REQUERENTE: GIST-BROCADES N.V., holandesa, com sede em
Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft,
Países Baixos

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES MUTANTES"

INVENTORES: Johannes Cornelis van der Laan e Christiaan
Albertus Gerardus van Eekelen, residentes na
Holanda

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

Patente europeia apresentado em 11 de Agosto de 1989, sob
o N.º. 89202117.1.



Descrição referente à patente de invenção de GIST-BROCADES N.V., holandesa, industrial e comercial, com sede em Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Países Baixos, (inventores: Johannes Cornelis van der Laan e Christiaan Albertus Gerardus van Eekelen, residentes na Holanda), para "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES MUTANTES".

DESCRIÇÃO

Ambito técnico

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de proteínas mutantes utilizando técnicas recombinantes de ADN. Mais especificamente, a invenção refere-se à produção eficaz de proteases de Bacillus de proteínas modificadas por engenharia genética utilizando uma estirpe hospedeira homóloga do Bacillus, na qual se eliminou a capacidade de produzir a protease não modificada correspondente.

Antecedentes da Invenção

Os Bacillus são muito utilizados para a produção de enzimas industrialmente importantes como por exemplo as α -amilases, proteases neutras e proteases alcalinas (ou serina), ver, por exemplo, Debabov: "The industrial use of Ba

cilli" em: The Molecular Biology of Bacilli, Acad. Press, Nova Iorque, 1982.

As principais vantagens da utilização dos Bacillus são as grandes quantidades de proteínas segregadas, a sua não produção de substâncias perigosas e a sua longa história de utilização industrial segura. Várias espécies de Bacillus foram assim aprovadas para a produção de proteínas destinadas a aplicações alimentares.

Palva e col., Gene 19 (1982) 81-87, demonstraram a possibilidade da utilização de Bacillus subtilis como hospedeiro de expressão para proteínas heterólogas, efectuando a expressão do gene de α -amilase a partir de B. amyloliquefaciens em B. subtilis. Outras referências descrevendo a expressão de gene heterólogo em B. subtilis são, por exemplo, Fahnstock e Fisher, J. Bacteriol. 165 (1986) 796-804, que demonstraram a expressão do gene da proteína A de Staphylococcus aureus; Schein e col., Biotechnology 4 (1986) 719-725, referiram a expressão do interferon- $\alpha 2$ humano; e Wang e col., Gene 69 (1988) 39-47, mostrando a expressão e secreção de factor- α natriurético humano. Para assegurar a secreção adequada destas proteínas heterólogas as duas primeiras referências utilizaram a sequência de sinais de α -amilase e a última referência a sequência de sinal do gene de subtilicina de B. subtilis (aprE) fundida ao gene a expressar.

Um problema importante das estirpes de Bacillus como hospedeiros de produção para proteínas recombinantes é que eles produzem e segregam várias proteases que tendem a degradar as proteínas heterólogas produzidas. Ver, por exemplo, Old e Primrose, "Principles of Gene Manipulation" 3ª ed. (1985) 289, Blackwell, Oxford.

No Pedido de Patente Internacional (PCT) WO 89/04866 é referida a importância das proteases extra-celulares; cerca de 90% da actividade proteolítica é atribuída à metaloprotease neutral (npr) e à protease de serina (protease alcalina = apr).

Foram propostas várias soluções para ultrapassar este problema de degradação.

Kawadura e Doi, J. Bacteriol. 160 (1984)

442-444, referiram um mutante duplo de B. subtilis deficiente em protease extracelular neutra e alcalina. Em primeiro lugar, tornou-se o B. subtilis DB100 numa protease negativa neutra por transferência das mutações de nprR2 e de nprE18 de B. subtilis NT18. Posteriormente, foi apagada por conversão de gene um fragmento de 178 bp contendo uma parte da apr.

Fahnestock e Fisher, Appl. Environ. Microbiol 53 (1987) 379-384, descrevem a construção de uma estirpe negativa apr de B. subtilis partindo de uma estirpe negativa de npr. Eles utilizaram um vector plasmídico contendo o gene apr e introduziram o gene de gato (conferindo uma resistência ao cloroanfenicol) quer como desactivador quer como marcador seleccionável. Posteriormente, o gene de apr cromossómico foi substituído por esta construção.

Sloma e col., J. Bacteriol. 170 (1988) 5557-5563, detectaram e sequenciaram um terceiro gene de protease extra-celular (epr) de B. subtilis. O apagamento parcial deste gene revelou que ele contribuía apenas marginalmente para a actividade extracelular da protease.

Numa inspecção mais pormenorizada das estirpes produzidas parece que nenhuma das estirpes de B. subtilis referenciadas era completamente isenta de actividade proteolítica extracelular. Assim, existe ainda uma necessidade de estirpes aperfeiçoadas de Bacillus deficientes em protease, que podem ser utilizadas na produção de proteínas heterólogas. Esta necessidade é ainda mais forte quando o objectivo é a expressão de proteases que sofreram mutação.

Em várias publicações é descrita a produção de proteases mutantes utilizando estirpes hospedeiras de Bacillus subtilis que são incapazes de expressar o gene de protease de tipo natural, evitando assim misturas de protease mutantes e de tipo natural.

Na publicação EP-A-0246678 (o teor deste pedido corresponde ao documento EP-A-0130756), é referido uma estirpe de B. subtilis que é incapaz de segregar a subtilisina enzimaticamente activa ou protease neutral, mas que expressa os genes de protease heteróloga isolados ou derivados de B. amyloliquefaciens. A mutagénese de saturação específica de sítio

foi efectuada no gene de B. amylofisquefaciens e foram expressos os mutantes. O fundo negativo das estirpes hospedeiro de B. subtilis foram obtidos apagando parcialmente um ou ambos genes de protease originais, ou por mutagenese com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). Foi ainda realçada que o hospedeiro de B. subtilis descrito é normalmente esporulante e que os mutantes asporogenosos não são satisfatórios para a produção de proteínas (recombinantes).

No documento WO 86/01825 (ver Fahnestock e Fisher, acima citados) são descritas estirpes de Bacillus, em particular B. subtilis, com teores de protease extracelular reduzidos. O gene de protease alcalina é desactivado por uma inserção in vitro de um gene que codifica para uma proteína que confere um tratamento fenotípico no microorganismo. O vector plasmídio contendo o gene de protease desactivado por inserção é transformado em B. subtilis e o gene desactivado substitui o gene nativo dos cromosomas por recombinação homóloga.

O documento WO 88/08033 refere análogos de subtilisina a partir de subtilisina de Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina BPN', uma subtilisina apr de B. subtilis e uma subtilisina de B. mesentericus. Estes mutantes são obtidos por substituição de um ou mais aminoácidos em ou próximo do sítio de ligação do cálcio com aminoácidos de carga negativa (por exemplo Asp ou Glu). Os mutantes são expressos em B. subtilis.

O documento WO/04866 refere uma estirpe de B. subtilis com uma reduzida actividade de segregação de protease, que foi obtido por introdução de uma mutação spoOH num mutante duplo apr⁻npr⁻, obtendo-se assim a estirpe asporogenosa. O mutante triplo obtido apr⁻npr⁻ SpoOH⁻ mostrava muito baixa actividade de protease segregada.

As referências acima discutidas descrevem a expressão de genes homólogos e heterólogos de B. subtilis e a construção de estirpes de protease negativa de B. subtilis. Parece que as estirpes de protease negativa preparados por apagamento parcial do gene da protease ou por inserção de outro gene no gene da protease apresentam várias desvantagens, por exemplo:

- O gene original pode ser reactivado. Se um gene que é homólogo

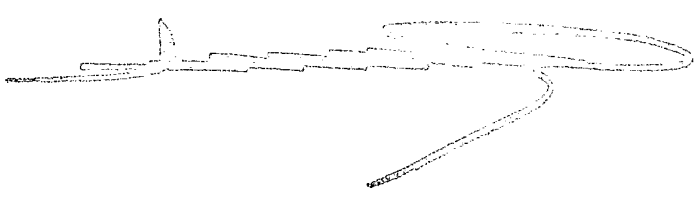
go do gene do cromossoma desactivado for introduzido na célula (por exemplo num plasmídio), a recombinação homóloga pode dar origem à reactivação do gene.

- O gene original, embora desactivado, pode conduzir à produção de produtos de expressão parcial, quando a região promotora estiver ainda activa. Isto constitui uma desvantagem em termos de eficiência metabólica.
- A introdução de tratamentos fenotípicos indesejáveis, por exemplo resistência a antibióticos, dependente do gene inserido.
- Instabilidade de plasmídio, devido a homologia entre uma sequência genómica e uma parte do plasmídio.

É assim desejável apagar todas as sequências com homologia possível entre o cromossoma e o plasmídio.

Existem também desvantagens para a produção da protease alcalina, ou outros enzimas, em B. subtilis. Embora Wells e col., Nucl. Acids Res. 11, (1983) 7911-7925 mostrem que a expressão de subtilina BPN' de B. amyloliquefaciens em B. subtilis seja possível com os seus próprios sinais de transcrição, Jacobs e col., Nucl. Acids Res. 13 (1985) 8913-8926 mostram que essa estratégia não é geralmente aplicável. Foi demonstrado que a região 5' de subtilisina Carlsberg deriva da de B. licheniformes não continha sinais funcionais para a transcrição em B. subtilis. Para conseguir uma produção considerável era necessário inserir um promotor de B. subtilis do gene em questão. É também sugerido que não apenas os processos de transcrição mas também os processos de translacção, segregação ou maturação possam ocorrer de forma menos eficaz em hospedeiros heterólogos, devido a uma sequência imperfeita de Shine Dalgarno ou mesmo incompatibilidade do produto do gene com o hospedeiro heterólogo.

Os problemas de expressão acima descritos podem ser evitados quando o produto é sintetizado numa estirpe de Bacillus homóloga, em que existe garantia de elevada capacidade de produção, com alto rendimento resultando em elevados níveis de produção.



RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um processo para a produção de proteases que diferem em pelo menos 1 aminoácido da protease de tipo natural, compreendendo o referido processo a utilização de uma estirpe de Bacillus alcalofílica homóloga como hospedeiro de expressão da referida estirpe que é incapaz de produzir a protease de tipo natural.

Num dos aspectos da presente invenção o gene de protease altamente alcalina é apagado do cromossoma, a estirpe negativa de protease obtida pode ser utilizada como hospedeiro para a expressão de proteases homólogas ou heterólogas.

Num outro aspecto da presente invenção o gene de protease altamente alcalina de cromossomas é substituído por uma cópia que sofreu mutação deste gene.

Também são proporcionados processos para construir as novas estirpes transformadas, e vectores utilizados para esse efeito e um processo para produzir proteases mutantes.

Numa realização preferida dos processos mutantes eles são obtidos de forma a regular uma homologia próxima das proteases originalmente produzidas pela estirpe correspondente.

As estirpes preferidas são os Bacillus da nova espécie de PB92, seus derivados e estirpes muito parecidas, transformadas por um gene que codifica a protease que sofreu mutação. O referido gene mostra pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 50% e mais preferivelmente pelo menos 80% de homologia com o gene de tipo natural de Bacillus PB92 que codifica a protease de serina. O gene é preferivelmente derivado de um gene de tipo natural e uma estirpe alcalofílica de Bacillus. As estirpes especialmente preferidas são os Bacillus alcalofílicos asporogénicos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a construção do plas-

mídeo pM58 Δ contendo partes das regiões de flaqueamento 5' e 3' do gene de protease alcalina do Bacillus nova espécie PB92.

A Figura 2 representa esquematicamente a introdução da origem sensível à temperatura da replicação do plasmídeo pE194neo-1 no plasmídeo pM58 Δ , dando origem ao plasmídeo pEM58 Δ .

A Figura 3 mostra a introdução por recombinação homóloga, do plasmídeo pEM58 Δ na região do flaqueamento 5' do gene de protease da estirpe Bacillus PBT110.

A Figura 4 mostra um mapa de restrição simplificado das regiões que rodeiam o gene da protease eliminado após uma recombinação ilegítima. Foram obtidas duas estirpes PBT125 e PBT126.

A Figura 5 é uma sequência de nucleótidos dos fragmentos HindIII de PBT125 (A) e PBT126 (B).

A Figura 6 mostra uma representação esquemática da introdução do gene da protease em M13 mp18.

A Figura 7 mostra a sequência de nucleótidos do plasmídeo pBHA-1.

A Figura 8 mostra a introdução do gene de protease da estirpe Bacillus PBT110 no plasmídeo pBHA1.

A Figura 9 mostra a reorientação a origem F1 contendo o fragmento BamHI do plasmídeo que dá pBHA1-MXL de pBHAR-MXL.

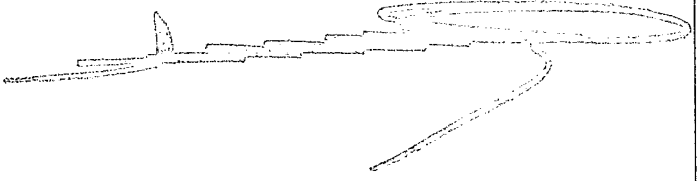
A Figura 10 mostra a subclonação da sequência 3' de protease altamente alcalina do plasmídeo pBHAR-MXL, dando origem ao plasmídeo pBHARB-MXL.

A Figura 11 mostra a eliminação da sequência de E. coli do plasmídeo pBHARB-MXL M216Q que dá origem ao plasmídeo pBHB-MXL M216Q.

A Figura 12 mostra a reorientação do gene de resistência à neomicina do plasmídeo pE194neo-1 dando origem ao plasmídeo pE194neo-3.

A Figura 13 mostra esquematicamente a introdução de origem sensível à temperatura da replicação do plasmídeo pE194neo-3 no plasmídeo pBHB-MXL M216Q dando origem ao plasmídeo pEN₃Q.

A Figura 14 mostra esquematicamente a



construção da estirpe de Bacillus estirpe PEP111.

A Figura 15 mostra esquematicamente a construção da estirpe de Bacillus estirpe PEP211.

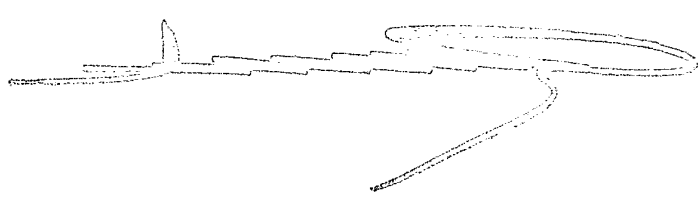
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As proteases de serina que são produzidas pelas estirpes que pertencem ao gene de Bacillus são habitualmente designados como proteases alcalinas. As proteases utilizadas na presente invenção são derivadas de Bacillus alcalofílicos, e são assim designadas como proteases alcalinas.

Para a produção de proteases altamente alcalinas são utilizados de preferência estirpes de Bacillus alcalofílicas como células hospedeiro. Para uma produção à larga escala são necessárias estirpes industriais. Elas são originadas de organismos que podem ser isolados do solo ou que estão disponíveis de depósitos ou de outras fontes e que são obtidas por modificação genética dessas estirpes de Bacillus. As estirpes industriais de Bacillus são definidas em EP-A-0134048. Elas são caracterizadas por serem resistentes à permuta genética, como por exemplo infecção ou transformação por fagos. As estirpes são estáveis e podem ou não podem ser susceptíveis de formação de esporos. Elas são habitualmente prototróficas e são modificadas para proporcionarem elevados rendimentos de produto de proteína endógenos, como por exemplo as enzimas alfa-amilases e várias proteases. O rendimento de um produto de proteína endógeno obtido num processo de produção industrial pode representar pelo menos 5 g/l (0,5% p/v). As estirpes industriais também segregam DNases, que resultam da degradação do ADN no meio, proporcionando uma protecção contra a permuta genética.

É vantajoso utilizar como estirpe hospedeiro a estirpe a partir da qual o gene de protease foi originalmente isolado, dado que apenas nesse caso se pode estar seguro de que todos os sinais necessários para expressão estão funcionais.

Uma vantagem adicional da utilização de Bacillus alcalofílicos como estirpes de produção é o risco mínimo de contaminação com outros microorganismos, dado o pH alcali



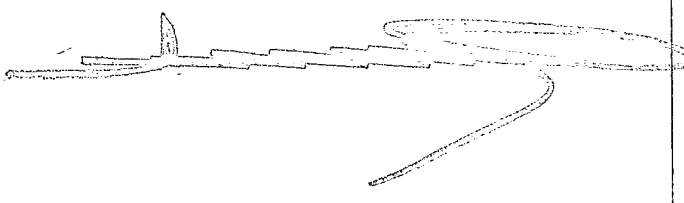
no durante a fermentação.

De acordo com a presente invenção, é referido um processo para a eliminação de um gene que codifica para a protease de Bacillus a partir do genoma de forma a que a regressão se torne impossível. A referida eliminação pode ser uma eliminação parcial (desde que as sequências deixadas nos cromossomas sejam para diminuir a recombinação homóloga com o gene da protease que codifica o plasmídio) mas mais preferivelmente o gene é completamente eliminado. A estirpe de protease negativa obtida por este processo é utilizada para a produção de protease mutantes homólogas após introdução de um vector de expressão contendo o gene que codifica esta protease mutante. É, contudo, entendido que esta estirpe de protease negativa pode também ser utilizada com vantagem para a expressão de outras proteínas quer homólogas quer heterólogas. Neste contexto consideramos que a expressão das proteases mutantes utilizadas como célula hospedeiro, as células em que o gene de tipo natural foi isolado, são de expressão homóloga.

Foi verificado que utilizando uma protease industrial para produzir a estirpe de Bacillus como hospedeiro para a produção dos mutantes desta protease, a elevada eficiência da produção da protease original é transferida para a protease mutante. Isto resulta numa eficiência de produção surpreendentemente superior comparada com as estirpes laboratoriais. Uma cópia de cromossomas do gene que sofreu mutação dá após expressão e secreção numa estirpe industrial um rendimento ainda superior a 50 cópias de plasmídio contendo o gene que sofreu a mutação, numa estirpe laboratorial.

Constitui um aspecto desta invenção o facto de as proteases mutantes poderem ser produzidas com eficiência por uma estirpe de Bacillus homóloga por permuta do gene dos cromossomas ou duma sua parte com o gene que sofreu a mutação correspondente. Deste modo a capacidade de produção para a protease do tipo natural é eliminada enquanto que ao mesmo tempo se introduz uma capacidade de produção para uma protease mutante.

Como célula hospedeiro para a expressão de genes que sofreram mutação codificando para proteínas de en-

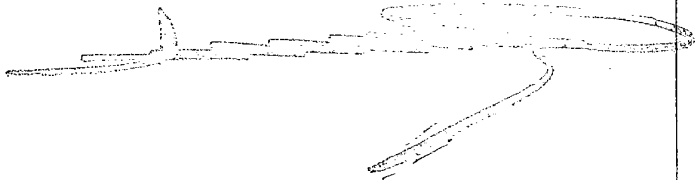


genharia modificadas, é preferível usar células em que os genes são estruturalmente expressos a um alto nível.

Noutro aspecto da presente invenção foi verificado com surpresa que os Bacillis asporogenosos podem ser utilizados para se obter um elevado nível de expressão do gene de protease.

A presente invenção também mostra (Tabela 1) que para se obter uma elevada produção da protease altamente alcalina derivada de Bacillus PB92 em B. subtilis, é preferível inserir um promotor que é activo em B. subtilis, em frente do gene. Se as enzimas derivadas de outros Bacillis forem produzidas, a inserção de B. subtilis de um promotor activo em B. subtilis ou outros sinais de expressão podem ser necessários, o que necessita de uma fase extra.

Os Bacillis produtores de protease altamente alcalina são taxonomicamente não muito bem classificados são geralmente referidos como estirpes de Bacillus alcalofílicos. Para a presente invenção definem-se os Bacillis alcalofílicos como estirpes de Bacillus que crescem em condições alcalinas de pH 9-11 (Horikoshi, K. e T. Akiba, 1982, Alkalophilic microorganisms, Springer Verlag, Nova Iorque). As proteases alcalinas produzidas por esses Bacillis são também designadas como proteases altamente alcalinas. Exemplos destas estirpes de Bacillus susceptíveis de crescerem em valores de pH alcalinos são descritas em, por exemplo, Patentes Norte Americanas N.ºs. 3 723 250, Re. 30 602 e 4 480 037. Um exemplo de uma estirpe hospedeiro de Bacillus alcalofílica é o Bacillus nova espécie PB92 referido entre outros na Patente Norte Americana N.º. Re. 30 602. Os derivados destas estirpes de Bacillus, que foram optimizados para a produção de proteases são utilizados para produzir as suas proteases à escala industrial (ver EP-A-0284126). Os produtos são utilizados em várias aplicações industriais por exemplo como aditivos em detergentes de lavandarias. Exemplos desses produtos são o Maxacal^R (Gist-brocades/IBIS), Savinase^R (NOVO), Esperase^R (NOVO). Mutantes desses produtos foram descritos no documento WO 89/06279, onde se afirma que eles são derivados de Bacillus lentus, e no Pedido de Patente Europeia pré-publicada EP-A-0328229.

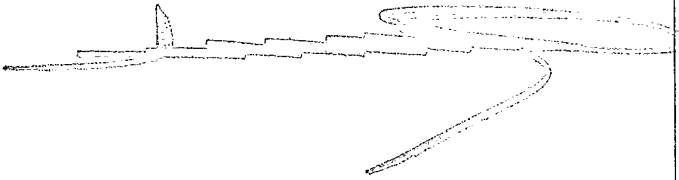


De acordo com uma realização preferida da presente invenção são proporcionadas estirpes de Bacillus transformadas que produzem os mutantes descritos na patente EP-A-0328229 e WO 89/06279, preferivelmente a uma escala industrial.

De acordo com a presente invenção, é utilizada adequadamente uma estirpe de Bacillus, em particular um Bacillus alcalofílico, preferivelmente Bacillus nova espécie PB92. Outro grupo preferido de estirpes de Bacillus são os mutantes asperogenosos dos quais PBT110 e os seus derivados são os mais preferidos. A transformação de estirpes de Bacillus alcalofílicos envolverá preferivelmente a utilização de protoplastos a partir das referidas estirpes. Contudo, o procedimento de transformação convencional de protoplastos descrito por Chang, S. e S.M. Cohen, Molec. Gen. Genet. 168 (1979) 111-115, não funciona para a estirpe de Bacillus alcalofílicas. Os protocolos necessários para estas estirpes foram apresentados em EP-A-0283075, que é aqui incluída como referência.

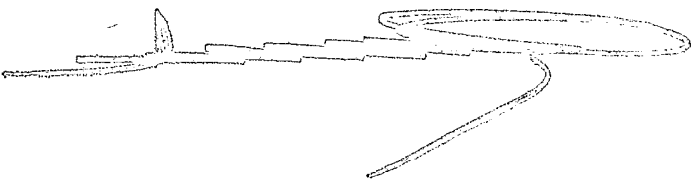
A expressão do gene de protease mutantes em hospedeiros homólogos necessita da substituição e/ou desactivação do gene do tipo natural. Podem ser utilizados alguns processos.

- (A) Um dos processos é efectuar uma clonação do gene ou de uma sua parte modificá-lo por mutagenese dirigida a sítios e re introduzir o gene (parcial) na célula num plasmídio. Por re combinação homóloga o gene pode ser introduzido no cromossoma. O resultado é uma situação em que o gene do tipo natural e o gene mutante estão localizados em pares. Após uma segunda recombinação a sequência modificada é deixada no cromossoma possuindo assim efectivamente introduzida a mutação no gene do cromossoma (tal como descrito na Figura 14).
- (B) Noutro processo a cópia do gene do cromossoma é desactivada por eliminação. Se a eliminação do gene é escolhida como estratégia o fragmento do gene do cromossoma que é eliminado é preferivelmente a região completa de codificação. Após a desactivação é levada a cópia mutante do gene desactivado para a célula com o vector de clonação.
- (C) Noutro processo a cópia do gene do cromossoma é mutageniza-



do. Em princípio é possível obter mutações (específicas) in vivo, após transformação das bactérias com oligonucleótidos que são mutagênicos. Esse processo foi utilizado com sucesso em fungos como é descrito por Moerschell e col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 524-528. Se for efectuado esse processo num homólogo, preferivelmente numa estirpe de Bacillus alcalofílica homóloga, isto é considerada uma realização da invenção.

A presente invenção refere-se a estirpes de Bacillus que são conhecidas como produtores eficazes de protease. Num dos processos preferidos a região de codificação da protease altamente alcalina completa é eliminada do cromossoma. Nesta realização é utilizado um vector contendo o gene de protease alcalina incluindo as suas regiões 5' e 3'. O gene de protease é eliminado do vector in vitro, deixando para trás as regiões de flaqueamento 5' e 3'. Este vector é levado para a estirpe de Bacillus alcalofílica. O vector é integrado no cromossoma através de uma recombinação homóloga da região de flaqueamento. A recombinação exterior e a resolução conduz a uma estirpe de Bacillus possuindo um gene de protease eliminado. O vector utilizado é preferivelmente um plasmídeo. Para tornar possível a selecção é introduzido um marcador que pode ser um plasmídeo preferivelmente resistente a antibióticos, por exemplo resistente à neomicina. O vector pode preferivelmente ser escolhido para ser integrado no cromossoma e isto pode ser conseguido por introdução de uma origem indutora de replicação, por exemplo uma origem sensível à temperatura como por exemplo a do pE194. O referido plasmídeo é introduzido numa célula hospedeira homóloga. Numa condição de alta temperatura, o plasmídeo não é susceptível de se replicar e assim os integradores do cromossoma podem ser escolhidos para isso. Os integradores são escolhidos a altas temperaturas na presença do antibiótico relevante (por exemplo neomicina). A resolução do plasmídeo do cromossoma hospedeiro pode deixar as regiões de flaqueamento no cromossoma enquanto se remove a região de codificação. Finalmente, o mutante resultante escolhido perdeu o gene marcador seleccionável (é sensível à



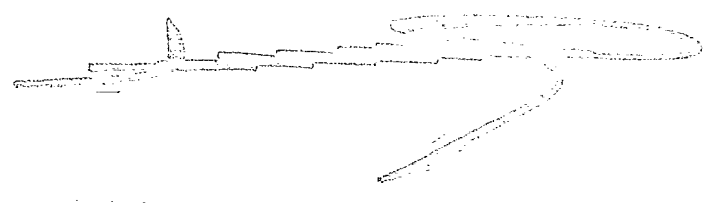
neomicina) e é protease negativa. A configuração final cromossômica é determinada por análise de restrição e revelação de Southern. A patente WO 88/06623 descreve com pormenor os mecanismos de integração possíveis. O gene de protease, modificado pela mutagenese dirigida aos sítios, é agora introduzido na célula de protease negativa num vector de expressão adequado. É preciso cuidado para que o plasmídio contenha poucas ou possivelmente nenhuma(s) sequências homólogas para o cromossoma para se evitar a instabilidade do plasmídio.

Em vez de expressar o gene de protease com a mutação de um vector é também possível integrar o gene de protease que sofreu mutação no cromossoma na estirpe negativa de protease. Isto pode ser conseguido deixando as regiões de flaqueamento do gene de protease que limitam o gene de protease que sofreu mutação no plasmídio. A introdução de um plasmídio desses pode dar origem a uma recombinação homóloga nas regiões de flaqueamento introduzindo assim o gene de protease que sofreu mutação no cromossoma da estirpe negativa de protease. Isto é especialmente vantajoso se o plasmídio se tornar instável. A presente invenção também mostra que uma quantidade de mutante recombinante ou de protease do tipo natural obtida é comparável ou mesmo mais elevada se for integrada uma cópia do gene no genoma e em seguida se existirem várias cópias do gene codificado por um plasmídio.

Numa realização ainda adicional o gene de protease altamente alcalina cromossômica é substituído pelo gene mutante por recombinação homóloga, sem isolamento prévio de uma estirpe de protease negativa.

A protease é expressa e pode ser isolada quer de células quer do meio quando a proteína é segregada. Após recuperação da protease ela pode ser purificada e formulada para se obter uma composição detergente. Assim, no sistema de produção descrito o gene do tipo natural foi completamente eliminado, a preparação da protease mutante é completamente livre da proteína de tipo natural.

O plasmídio pM58, construído como descrito na patente EP-A-0284126, contém um gene de protease completamente alcalina. Para se obter o plasmídio de desactivação a re-



gião de codificação do gene da protease é eliminado por uma dupla digestão de BaII/HpaI. A origem sensível à temperatura da replicação de pE194neo-1 é posteriormente introduzida. A construção pEM58 Δ é introduzida na estirpe de Bacillus PBT110.

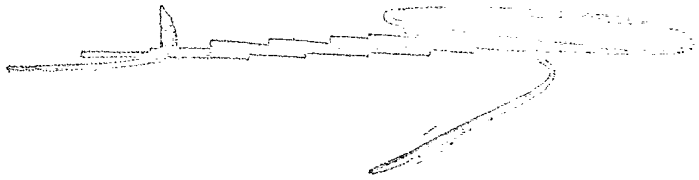
A integração pelo mecanismo designado pelo tipo de Campbell teve lugar na região de flanqueamento 5' do gene da protease, resultando numa estirpe de protease positiva contendo todo o vector plasmídio no seu cromossoma no sítio da protease (tal como se mostra na Figura 3).

A selecção posterior para derivados de protease negativa dessa estirpe revelou duas estirpes PBT125 e PBT126, que tinham perdido o gene de protease e o marcador de neomicina. Uma análise adicional revelou que nesta segunda fase tinha ocorrido uma recombinação ilegítima.

Dado que as estirpes de Bacillus obtidas não apresentavam uma actividade detectável de protease elas podiam ser utilizadas para a expressão dos genes de protease alterada. Será óbvio que o PBT125 e o PBT126 são apenas exemplos. Dado que a recombinação ilegítima dará origem a resultados diferentes será essencial determinar se o gene completo foi eliminado. Para se obterem estirpes mais específicas, podiam ter sido feitos recombinantes homólogos.

Os exemplos aqui apresentados descrevem principalmente duas realizações específicas da invenção. Uma delas é a produção de uma protease mutante codificada para plasmídio a partir de uma estirpe de protease negativa. A outra é a produção de uma protease mutante em que o gene que sofreu a mutação foi introduzido no genoma por permuta de genes. Será obviamente óbvio para o especialista que são possíveis outras realizações, por exemplo: integração cromossômica numa estirpe de protease negativa, uma cópia do gene que sofreu mutação no plasmídio e integrado no cromossoma, mais do que uma cópia do gene que sofreu a mutação localizada em pares ou em posições diferentes no cromossoma. Os seguintes exemplos são apresentados como ilustração e não como limitação.

SECÇÃO EXPERIMENTAL



EXEMPLO 1

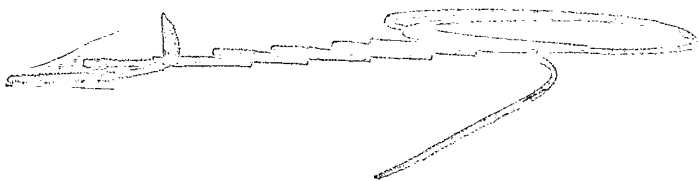
Construção do Plasmídio de Desativação pEM58 Δ

Fez-se a digestão do plasmídio pM58 Δ (ver EP-A-0284126) com enzimas de restrição BalI e HpaI. Contendo o grande fragmento das sequências de flanqueamento do gene de protease foi purificado (Maniatis, Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor 1982) e ligado. A mistura de ligação foi transformada (Spizizen e col., J. Bacteriol. 81 (1961) 741-746) para Bacillus subtilis DB104 (Kawamura e Doi, J. Bacteriol. 160 (1984) 442-444) e escolhida para transformantes resistentes à neomicina e de protease negativa em placas mínimas contendo 0,4% de caseína e 20 ug/ml de neomicina.

O plasmídio pM58 Δ foi isolado e caracterizado por análise de enzima de restrição. Tal como se mostra na Figura 1 o plasmídio pM58A contem as sequências de flanqueamento do gene de protease altamente alcalina, codificando o gene para a resistência à neomicina e uma origem de Bacillus de replicação.

Para construir um plasmídio de integração contendo uma origem sensível à temperatura de replicação, pM58 Δ foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e BglIII. O fragmento que continha as sequências de flanqueamento de protease altamente alcalina foi purificado e ligada ao fragmento (purificado) XbaI/BglIII de pE194neo-1 (EP-A-0284126) contendo a origem sensível à temperatura da replicação, derivada de pE194 (Jordanescu e col., Plasmid 1 (1978) 468-479), após o referido fragmento ter sido purificado da forma anteriormente descrita. A mistura de ligação foi transformada para B. subtilis DB104 e escolhida para a resistência à neomicina (ver acima). O plasmídio pEM58 Δ foi isolado e caracterizado (Figura 2). Ele contem o gene resistente à neomicina, a origem sensível à temperatura da replicação de pE194 e as sequências de flanqueamento do gene de protease alcalina.

Este plasmídio pEM58 Δ foi utilizado para transformar a estirpe de Bacillus PBT110.



EXEMPLO 2

Construção de uma Estirpe de Bacillus Alcalofílica de Protease Negativa

A. Transformação protoplástica de Bacillus PBT110 por plasmí- dio pEM58Δ

A estirpe de Bacillus PBT110 é um mutante asporagenoso de Bacillus nova espécie PB92 (Patente Norte Americana Nº. Re. 30 602) e foi obtida por procedimentos clássicos de mutação (UV). Esta estirpe foi transformada com o plasmídeo pEM58Δ semelhante ao processo descrito na Patente EP-A-0284126. Antes das experiências de integração, foi verificado por análises de enzima de restrição se os transformantes continham o plasmídeo relevante.

B. Integração de pEM58Δ no cromossoma de Bacillus PBT110

A integração de pEM58Δ no cromossoma da estirpe de Bacillus PBT110 foi efectuada da forma descrita na Patente EP-A-0284126. A escolha dos integrantes ocorreu numa concentração de neomicina de 1 µg/ml. A organização genética do integrante foi determinada por análise da enzima de restrição seguida por revelação de Southern e análise de hibridização e é apresentada na Figura 3. Parecia que a integração de pEM58Δ tinha lugar através de um mecanismo designado por tipo de Campbell por recombinação homóloga na região de flanqueamento 5' do gene de protease alcalina, resultando numa estirpe de Bacillus PBT110-INT5.

C. Seleção de estirpes de protease negativa

A estirpe de Bacillus PBT110-INT5 foi inoculada em 100 ml de caldo de soja tríptico (TSB) contendo 1 µg/ml de neomicina e incubou-se durante 24 horas a uma temperatura de 50°C.

Após 24 horas foram inoculados 0,1 ml da cultura obtida num frasco de agitação de 500 ml contendo 100 ml de meio mínimo de PBT : K₂HPO₄, 17.42 g/l; glutamato, 13.36 g/l; sódio citrato.H₂O 2 g/l; FeSO₄.7H₂O, 0.05 g/l;


ZnSO₄.7H₂O, 1 mg/l; MnSO₄.H₂O, 1 mg/l; CaCl₂.2H₂O, 10 mg/l; MgSO₄.7H₂O, 0.2 g/l; CuSO₄.5H₂O, 0.5 mg/l; H₃BO₃, 0.5 mg/l; Na₂MoO₄.2H₂O, 0.5 mg/l; CoCl₂.6H₂O, 0.5 mg/l; Biotina, 0.5 mg/l; sacarose, 20 g/l; (pH 8,0, esterilizado durante 20 min a 120°C). Após a esterilização foi adicionado 1 mg/l de tiamina.

Esta cultura foi incubada a 37°C durante 4 dias. Passados 4 dias, diluiu-se 1 ml da cultura em 100 ml do mesmo meio e incubou-se durante 4 dias. Passados 4 dias. Passados 4 dias a cultura foi colocada em placas de meio mínimo PBT contendo adicionalmente 0,4% de caseína e 15 g/l de ágar. As colônias a que faltava uma protease halo detectável foram consideradas protease negativa e foram ensaiadas para a determinação da ausência de gene codificando a protease alcalina PBT110.

D. Caracterização das estirpes da protease negativa

As estirpes que não apresentavam um halo detectável nas placas de caseína descritas na secção anterior foram em primeiro lugar ensaiadas para a determinação da presença de um fenotipo sensível à neomicina e asporogenoso. Duas estirpes, Bacillus PBT125 e PBT126, que continham a protease negativa e o fenotipo asporogenoso foram ensaiadas para a determinação da produção de protease em frascos de agitação de 500 ml contendo 100 ml de meio de produção de protease, da forma descrita na Patente Norte Americana Nº. Re. 30 602. Nenhuma das estirpes produziu quantidades detectáveis de protease.

A organização genética das duas estirpes foi determinada pela análise de enzimas de restrição e revelação cromossômica que é representada na Figura 4. Não ocorreu recombinação homóloga, mas sim ilegítima, resultando em duas estirpes que eliminavam completamente os genes resistentes à protease e à neomicina. Contudo, parecia ter sido deixado um pequeno fragmento de plasmídeo no cromossoma após eliminação do gene da protease. A sequência deste fragmento foi determinada da forma seguinte. Os fragmentos de cromosso

ma HindIII das estirpes PBT125 e PBT126 contendo as junções de plasmídio/cromossoma foram ligadas num vector fago M13 mp18 (Messing e col., Nucl. Acids Res. 9 (1981) 303-321) e transfectadas para E. Coli JM101 de acordo com o procedimento descrito por Cohen e col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 2110-2114. Após a propagação do fago em E. coli JM101, foi isolado ssADN (Heidecker e col., Gene 10 (1980) 69-73).

As inserções foram sequenciadas utilizando o processo descrito por Sanger e col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 6463. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 5A e 5B, respectivamente.

EXEMPLO 3

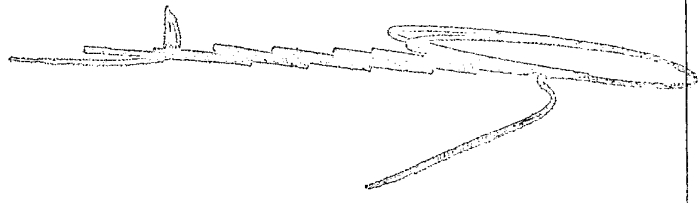
Construção de Vectores de Produção e Mutação de Protease

A. Subclonação do gene da protease PB92 no fago M13 mp18

Foi feita a digestão do plasmídio pM58 com HpaI e BalI. Após purificação do fragmento de ADN contendo o gene de protease (Maniatis, 1982) este fragmento foi ligado ao fago M13 mp18 foi digerido com SmaI. A mistura de ligação foi transfectada e E. coli JM101 (Cohen e col., supra). Após a propagação do fago em E. coli JM101, foi isolado o dsADN de acordo com o processo descrito por Birnboim e Doly (Nucl. Acids Res. 7 (1979) 1513-1523). A inserção e a sua orientação foram verificadas por análise de enzima de restrição. O vector mp18 MXL foi utilizado para experiências de subclonação adicionais e é representada na Figura 6.

B. Subclonação do gene de protease PN92 no plasmídio pBHA1

A Figura 7 mostra a sequência de nucleótidos do plasmídio pBHA1. Este plasmídio é derivado do sistema de vector geminal pMa/c5-8 descrito por Stanssens e col., (Nucl. Acids Res. 17 (1989) 4441-4454), em que foi inserido um promotor adicional. O plasmídio BHA1 consiste nos seguintes fragmentos:



pos 11-105: bacteriófago FD, terminador;
pos 121-215: bacteriófago FD, terminador;
pos 221-307: uma parte de plasmídeo pBR322 (isto é posições 2069-2153);
pos 313-768: bacteriófago Fl, origem de replicação isto é pos 5482-5943);
pos 772-2571: parte do plasmídeo pBR322, isto é a origem de replicação e o gene de -lactamase;
pos 2572-2685: transposição Tn903, genoma completo;
pos 2719-2772: terminador de triptofano (duplo);
pos 2773-3729: transposição Tn9, o gene de cloranfenicol-acetil-transferase "(=cat)". Os nucleótidos na pos 3005(A), 3038(C), 3302(A) e 3409(A) diferem de sequência de codificação "cat" natural. As mutações foram introduzidas para eliminar os sítios NcoI, BalI, EcoRT e PvuII;
pos 3730-3804: sítio de clonação múltiplo;
pos 3807-7264: parte do plasmídeo pUB110 (isto é a replicação e gene de resistência à canamicina, fragmento EcoRI PvuII) (McKenzie e col., Plasmid 15 (1986) 93-103 e Plasmid 17 (1987) 83-85);
pos 7267-7331: sítio de cloração múltipla.

Os fragmentos foram combinados utilizando técnicas conhecidas de clonação, por exemplo, enchimento nas extremidades com Klenow, clonação de adaptação, etc.. Todos estes dados foram derivados de Genbank^R National Nucleic Acid Sequence Data Bank' NIH, U.S.A.. O plasmídeo pMc5-8 foi depositado com o número DSM 4566.

Antes dos procedimentos de mutação o sistema de vector geminal pBHA/C-1 foi modificado para se obter o sistema de vector geminal pBHARB-MXL/pBHCRB-MXL, da forma seguinte:

1. O vector mpl8-MXL foi digerido com KpnI e HincII. O fragmento de ADN contendo o gene de protease foi purificado e ligado em pBHA1 que foi digerido com EcoRV e KpnI. A mistura de ligação foi transformada em E. coli JM101 (Maniatis, 1982) e colocado em placas LC⁺ contendo 10 g/l de tripton, 5 g/l de extracto de fungo (Difco), 8 g/l de NaCl, 25 mg/l de ti-

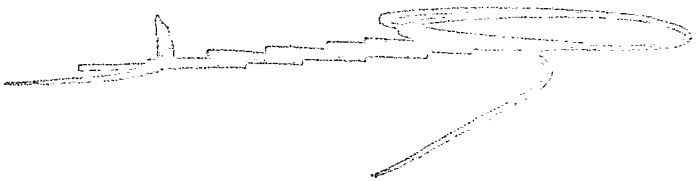
mina, 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina e 20 $\mu\text{g/ml}$ de neomicina pH 7.0. O plasmídio de ADN dos transformantes foi isolado (Birnboim, supra) e caracterizado por análise de enzima de restrição. Desta forma foi isolado pBHA1-MXL (ver Figura 8).

2. De modo a sequenciar as mutações introduzidas no gene da protease com um conjunto disponível de oligonucleótidos, foi necessário inverter a orientação da origem Fl comparada com o gene da protease. Isto foi efectuado da seguinte maneira : o plasmídio pBHA1-MXL foi digerido com BamHI e religado. A mistura de ligação foi transformada em E. coli WK6 (Maniatis, supra) e escolhida para resistência à neomicina ou ampicilina em placas LC^+ contendo 10 g/l trypton, 5 g/l Yeast Extract (Difco), 8 g/l NaCl, 25 mg/l thymine, 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 20 $\mu\text{g/ml}$ neomycin pH 7.0. O ADN de plasmídio dos transformantes foi isolado (Birnboim, supra) e caracterizado por análise de enzima de restrição. Desta maneira foi isolado o pBHAR-MXL, que diferia do pBHA-MXL por a orientação da sequência de E. coli ser invertida, (ver Figura 9).
3. Para a introdução de sequências adicionais de flanqueamento no plasmídio pBHAR-MXL, foram feitas as seguintes digestões. O plasmídio pM58 foi digerido com SphI e HindIII. O plasmídio pBHAR-MXL (Figura 10) foi digerido com SphI e HindIII. O fragmento maior foi purificado. Ambas as digestões foram ligadas e transformadas em B. subtilis DB104 e escolhidas para a resistência à neomicina e actividade de protease em placas mínimas contendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de neomicina e 0,4% de caseína. Os transformantes foram caracterizados por análise de enzima de restrição. Um destes, pBHARB-MXL (Figura 10), foi utilizado para outras experiências.

C. Mutagénese do gene PB92 no plasmídio pBHARB-MXL

A mutagénese foi efectuada com o sistema de vector geminal pBHARB-MXL/pBHCRB-MXL (Stanssens, supra).

Foi utilizado um processo baseado na



técnica de duplex com separação (Kramer e col., Nucl. Acids. Res. 12 (1984) 9441) e um plasmídio (fago/plasmídio híbrido). O processo baseia-se essencialmente num intermediário de ADN duplex separado consistindo de uma banda separada (banda-) contendo um marcador resistente a antibióticos de tipo natural e uma banda modelo (banda+) contendo uma mutação âmbar no gene conferindo a resistência ao antibiótico. Após estabilização, o oligonucleótido mutagénico torna-se incorporado na banda separada durante a reacção de enchimento e selagem in vitro da separação. As moléculas resultantes são utilizadas para transformar uma deficiência de reparação de incoerência (Mut S) hospedeira em que a ligação entre a mutação pretendida e o marcador da resistência ao antibiótico é conservada. A população de plasmídios mistos, isolados desta estirpe, é em seguida deixada segregar na estirpe hospedeira negativa do supressor. Os transformantes são placados num meio contendo antibiótico, impondo assim uma selecção para a progenia derivada da banda separada.

No vector do tipo pMa o nucleótido 3409 é alterado de G para A, enquanto que no vector tipo pMc o nucleótido 2238 é alterado de G para C, criando códiões de paragem âmbar no gene de cloranfenicol-acetil-transferase e no gene de β -lactamase, respectivamente, tornando os referidos genes inactivos.

Para efectuar a mutagénese o fragmento de ADN alvo é clonado no sítio de clonagem múltipla de pMa5-8 ou num seu derivado. É em seguida construído um duplex separado entre pMa5-8 contendo o ADN alvo e pMc5-8.

A separação de banda simples, consistindo do ADN alvo, pode ser submetida a mutagénese com um oligonucleótido mutagénico, com oligonucleótidos sintéticos longos possuindo um pequeno teor de nucleótidos incorporados, utilizando uma desincorporação química ou enzimática de nucleótidos. Para uma descrição detalhada, ver Ausubel e col., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque; ou B. Perbal, 1988, A practical Guide to Molecular Cloning, 2ª ed. John Wiley & Sons Inc; Nova Iorque.

D. Construção de Vectores para a Produção Industrial de Protease

Após a introdução das mutações pretendidas no plasmídeo pBHARB-MXL, as sequências indesejadas de E. coli do plasmídeo foram eliminadas da forma seguinte: o plasmídeo pBHARB-MXL contendo a mutação importante foi digerido com BamHI e religado em condições diluídas. A mistura de ligação foi transformada em B. subtilis DB104 e escolhida para a resistência à neomicina e actividade da protease em placas mínimas contendo 20 µg/ml de neomicina e 0,4% de caseína. O ADN dos transformantes foi isolado e caracterizado por análise de enzima de restrição. Desta forma foram isolados vectores a que faltava o ADN de E. coli, que são adequados para a produção comercial de proteínas.

O procedimento anterior é ilustrado na Figura 11, em que a mutação de M216Q é tomada como exemplo, resultando no plasmídeo pBHB-MXL M216Q. M216Q, assim como M216S, S160D e N212D referidos em seguida, são proteases mutantes de Bacillus PB92, descritas na Patente EP-A-0328229.

EXEMPLO 4

Transformação de Protoplastos de Bacillus PBT125 por Derivados do Plasmídeo pBHB-MXL

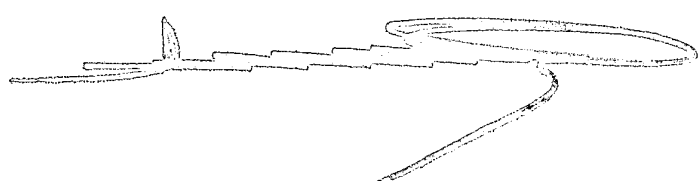
A estirpe Bacillus PBT125 foi transformada pelo plasmídeo pBHB-MXL ou os seus plasmídios derivados contendo genes de protease mutante, segundo o procedimento de transformação de EP-A-0284126. Antes dos estudos de produção, os transformantes foram ensaiados por análise de enzima de restrição para verificar se contêm o plasmídeo relevante.

EXEMPLO 5

Construção dos Vectores de Integração da Protease

A. Vector de Integração pEN₃Q

O plasmídeo pE194neo-1 (EP-A-0284126)



foi digerido com SalI e religado. A mistura de ligação foi transformada em B. subtilis DB104 e escolhida para resistência à neomicina em placas mínimas contendo 20 ug/ml de neomicina. O plasmídeo pE194neo-3 foi isolado e ensaiado na presença do gene de resistência à neomicina numa orientação inversa (ver Figura 12). O plasmídeo pE194neo-3 foi digerido com HpaI e BglIII. O fragmento contendo a origem de replicação sensível à temperatura foi purificado (Maniatis, supra).

O plasmídeo pBHB-MXL M216Q (ver Exemplo 3 e Figura 11) foi digerido com BglIII e BalI. O fragmento contendo o gene de protease foi purificado. Ambos os fragmentos foram ligados. A mistura de ligação foi transformada para B. subtilis DB104 e escolhida para a actividade de protease e resistência à neomicina como anteriormente descrito. Os transformantes foram caracterizados por digestões de enzima de restrição. Um destes, contendo o plasmídeo pEN₃Q, foi o escolhido (Figura 13). Este plasmídeo continha o gene de resistência à neomicina, a origem sensível à temperatura de replicação do plasmídeo pE194neo-3 e a mutação M216Q no gene da protease de PB92.

B. Vector de Integração pEN₃S.

Da forma descrita para o vector de integração pEN₃Q, o pEN₃S foi construído utilizando pBHARB-MXL M216S como vector de partida.

EXEMPLO 6

Construção de Estirpes de Bacillus PEP111 e PEP112

A. Transformação de Protoplastos de Bacillus PBT110 pelo Plasmídeo pEN₃Q

A estirpe de Bacillus PBT110 foi transformada com o plasmídeo pEN₃Q como descrito em EP-A-0284126. Antes das experiências de integração, foi ensaiado por análise de enzima de restrição se os transformantes continham o plasmídeo importante.

B. Integração de pEN₃Q em cromossomas de Bacillus PBT110



As experiências de integração com o plasmídeo pEN₃Q em cromossoma da estirpe Bacillus PBT110 foram efectuadas da forma descrita em EP-A-0284126. A escolha dos integrantes ocorreu para uma concentração de neomicina de 1 ug/ml a temperaturas não permitidas (50°C) para a replicação de plasmídeo. Para verificar a integração de pEN₃Q no cromossoma, foi isolado o ADN cromossômico de integrantes potenciais foi digerido com HindIII ou ClaI, tratado com um gel de agarose com 0,8% de ADN e revelado em nitrocelulose (Southern, J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-517) e hibridizado com ³²P marcado com translação de corte de pEN₃Q de ADN (Maniatis, 1982).

Demonstrou-se que a integração de pEN₃Q ocorria por recombinação homóloga resultando numa estirpe (PBT110M/Q) com dois genes de protease (um do tipo natural e um mutante M216Q) localizados em seguimento no cromossoma. Assim, a integração de pEN₃Q ocorria por um mecanismo chamado de tipo Campbell como representado na Figura 14 (ver também EP-A-0284126).

C. Seleção dos recombinantes sensíveis à neomicina

Foram escolhidos recombinantes sensíveis à neomicina, que continham ou o gene do tipo natural ou o gene da protease mutante no cromossoma (de agora em diante referido com "outrecombinantes"). O procedimento de seleção é semelhante ao procedimento atrás descrito no Exemplo 2C.

A estirpe PBT110 M/Q foi utilizada com estirpe de partida. Após se ter incubado a estirpe PBT110 M/Q em meio mínimo PBT, foi placada a cultura em placas de meio mínimo PBT contendo 0,4% de caseína e 15 g/l de ágar. Estas placas foram incubadas durante 48 h a 37°C e as réplicas placadas em placas de infusão de Heart (HI) contendo 1 ug/ml de neomicina e sem neomicina, respectivamente. As colônias sensíveis à neomicina foram consideradas "outrecombinantes".

D.- Caracterização de recombinantes sensíveis à neomicina

Foi isolado o ADN cromossômico de oute

combinantes potenciais, digeridos com ClaI ou HindIII, processadas no gel a 0,5% de agarose, reveladas com nitrocelulose (Southern, 1975) e hibridizadas com pEN₃Q de translação de corte com ³²P (Maniatis, 1982). Dado que a mutação de M216Q resulta na remoção de um sítio de ClaI, as estirpes contendo uma protease de tipo natural ou um gene de protease mutante, e a estirpe intermédia PBT110 M/Q podem ser facilmente distinguidas, ver Fig. 14.

Foi isolado um outrecombinante contendo o gene de protease mutante M216Q de PB92. Após se ter mostrado que tinha ocorrido uma substituição do gene de protease do tipo natural PB92 para a protease mutante PB92, o produto da estirpe foi caracterizado pelos seus parâmetros bioquímicos (k_{cat} , K_m), resistência à oxidação, actividade específica e capacidade de lavagem, como descrito em EP-A-0328229. Todos os resultados eram idênticos a uma protease de controlo M216Q, indicando que o produto da estirpe transformada era de facto a protease PB92 contendo a mutação M216Q. Esta estirpe transformada é designada por Bacillus PEP111.

Foram efectuadas experiências semelhantes utilizando o vector pEN₃S para construir a estirpe de Bacillus PEP112, que contem a protease PB92 com a mutação M216S.

EXEMPLO 7

Construção das Estirpes de Bacillus PEP211 e PEP212

A estirpe de Bacillus PEP 111 foi transformada com o plasmídeo pEN₃Q, seguindo o procedimento descrito em EP-A-0284126. Antes do procedimento de integração, ele foi analisado por análise de enzima de restrição para saber se os transformantes continham o plasmídeo relevante. O procedimento de integração e a selecção de integrantes (para uma concentração de neomicina de 20 ug/ml a temperaturas não permitidas (50°C) para a replicação de plasmídios foi efectuada da forma descrita em EP-A-0284126.



Para verificar a integração do plasmí-
dio pEN₃Q no cromossoma, o ADN cromossômico de integrantes po-
tenciais foi isolado e digerido com HindIII, processado em géis
de agarose a 0,8%, revelado em nitrocelulose (Southern e col.
1979) e hibridizado com pEN₃Q de translação marcado com ³²P.
Verificou-se que se tinha isolado uma estirpe contendo dois ge-
nes de protease mutantes, localizados separadamente no cromosso-
mas. Esta estirpe é designada como PEP211. A sua organização
cromossômica é representada na Figura 15.

Para se obter uma estirpe análoga con-
tendo dois genes de protease com a mutação M216S, transformou-
-se a estirpe PEP112 contendo um gene mutante (M216S) após sub-
stituição do gene, do gene do tipo natural, com o plasmídeo
pEN₃S e foram seguidos os procedimentos acima descritos. Estas
experiências resultaram numa estirpe PEP212 contendo os dois ge-
nes de protease mutante PB92 M216S localizados separadamente no
cromossoma.

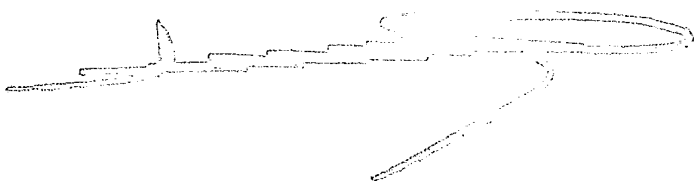
EXEMPLO 8

Produção de Protease Mutantes

A produção de proteases mutantes foi
efectuada com estirpes de Bacillus modificadas em que o gene co-
difica a protease que sofreu a mutação foi localizado ou num
plasmídeo ou no cromossoma.

Para a produção de plasmídeo codificado
foram utilizados dois tipos de estirpes, a estirpe alcalofílica
de Bacillus PBT125, tal como aqui descrita, e estirpe B. subti-
lis DS12367, uma estirpe asporogênica derivada de B. subtilis
DB104 (Kawamura e col., J. Bacteriol. (1984) 160, 442-444). Es-
tas estirpes foram transformadas com pBHB-MXL de plasmídios de-
rivados. Os Bacillus PBT125 e B. subtilis DS12367, que não pos-
suíam plasmídios codificadores de protease, foram utilizados co-
mo estirpes de controlo.

Para a produção com estirpes contendo
genes mutantes de protease cromossomicamente integrados, as es-
tirpes de Bacillus PEP, tal como aqui descritas, foram as utili-



zados. As estirpes de Bacillus PBT 108 e 110, contendo os genes de protease de tipo natural foram utilizadas como estirpes de controlo. A PBT108 é uma estirpe contendo dois genes de tipo natural localizados separadamente no cromossoma, ver EP-A-0284126. Para PBT110, ver Exemplo 2A.

Para verificar a actividade do promotor original do gene de protease PB92 em B. subtilis, foi feita uma construção, pBHB-MXLR, em que a orientação do gene de protease para o promotor HpaII (Zyprian e col., DNA 5 (1986) 219-225) foi invertida, de forma a que a expressão do gene de protease é apenas dirigida pelo seu promotor original.

As produções foram efectuadas em frascos de agitação de 500 ml contendo 100 ml de meio de produção de protease.

Quando se utilizaram estirpes de Bacillus alcalofílicas, as culturas foram incubadas, após inoculação, durante 40 horas a 37°C num meio de produção da forma descrita na Patente Norte Americana Nº. Re. 30 602. No caso de estirpes contendo plasmídios, foi adicionada neomicina (20 µg/ml).

Quando se utilizaram estirpes B. subtilis DS12367, foi adicionado um meio comparável contendo 12.5 g/l de Extracto de Levedura (Difco), 0.97 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.25 g/l de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l de citrato, 0.5 ml de antiespumante 5693, 6% p/p de maltose, e foi aplicado um tampão de fosfato 0,2 M a pH 6,8. No caso de estirpes contendo plasmídios, foi adicionada a neomicina (20 µg/ml).

As culturas contendo as estirpes de B. subtilis foram incubadas durante 65 horas a 37°C. Em todos os casos os frascos de agitação foram inoculados com 0,1 ml de uma cultura de Caldo de Soja Triptico contendo 20 µg/ml de neomicina de tipo relevante que tinha sido incubada durante 24 horas a 37°C.

A actividade da protease foi avaliada utilizando dimetilcaseína como substrato da forma descrita por Lin e col., J. Biol. Chem. 244 (1969) 789-793. As actividades específicas mutantes da protease (EP-A-0328229) foram utilizadas para determinar a produção numa base de mg.

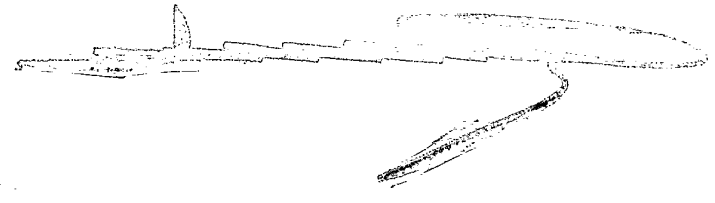
Os resultados das experiências de fermentação são resumidos na Tabela 1 seguinte.

TABELA 1

<u>Estirpe</u>	<u>Produção relativa de protease</u>	<u>Mutação</u>
PBT110	100%	WT
PBT125	0%	-
PBT108	120%	WT
PEP111	100%	M216Q
PEP112	100%	M216S
PBT125 pBHB-MXL	95-100%	WT
PBT125 pBHB-MXL M216Q	95-100%	M216Q
PBT125 pBHB-MXL M216S	95-100%	M216S
PBT125 pBHB-MXL S160D	95-100%	S160D
PBT125 pBHB-MXL N212D	95-100%	N212D
PEP211	120%	M216Q
PEP212	120%	M216S
DS12367	0-1%	-
DS12367 pBHB-MXLR	4%	WT
DS12367 pBHB-MXL	40%	WT
DS12367 pBHB-MXL M216Q	40%	M216Q
DS12367 pBHB-MXL M216S	40%	M216S
DS12367 pBHB-MXL S160D	40%	S160D
DS12367 pBHB-MXL N212D	40%	N212D

Todas as publicações incluindo pedidos de patente) mencionadas nesta especificação são indicadores para os especialistas a que a invenção se refere. Todas as publicações são aqui incorporadas como referência na extensão em que cada publicação individual foi especificamente e individualmente mencionada como incorporada como referência.

Embora a invenção anterior tenha descrita com algum pormenor como ilustração e exemplo com o objectivo de clareza e de compreensão, será óbvio para os especialistas que podem ser feitas muitas alterações e modificações sem se afastar do espírito e âmbito das reivindicações anexas.



REIVINDICAÇÕES

- 1a -

Processo para a produção de proteases mutantes que diferem das proteases do tipo natural em pelo menos um aminoácido, caracterizado por compreender a utilização de uma estirpe de Bacillus alcalofílica homóloga como hospedeiro de expressão, sendo a referida estirpe incapaz de produzir a protease do tipo natural.

- 2a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se empregar como hospedeiro de expressão uma estirpe de Bacillus alcalofílica negativa a protease.

- 3a -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se empregar como hospedeiro de expressão uma estirpe de Bacillus alcalofílica negativa a protease e em que o gene de protease do tipo natural é suprimido do genoma.

- 4a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por se empregar um derivado negativo de protease de Bacillus novo especies PB92.

- 29 -



- 5a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se empregar uma estirpe de Bacillus alcalofílica asporogênica.

- 6a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado por se empregar um Bacillus asporogênico de que se suprimiu o gene da protease natural por recombinação homóloga ou ilegítima.

- 7a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a protease mutante muito alcalina ser codificada por plasmídio.

- 8a -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado por a protease muito alcalina do tipo natural ter essencialmente a sequência de aminoácidos de protease de Bacillus novo especies PB92.

- 9a -

Processo de acordo com as reivindicações

- 30 -

1 a 6, caracterizado por se suprimir o gene de protease muito alcalina do tipo natural do cromossoma e se inserir no genoma pelo menos uma cópia de um gene de protease muito alcalina mutante.

- 10a -

Processo de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por se substituir o gene de protease muito alcalina do tipo natural por pelo menos uma cópia do gene mutante de protease muito alcalina.

- 11a -

Processo de acordo com as reivindicações 9 ou 10, caracterizado por se inserir pelo menos uma cópia de um gene mutante de protease muito alcalina no genoma e se codificar com o plasmídio outra cópia.

- 12a -

Processo para a obtenção de uma estirpe de Bacillus alcalofílica tendo um nível reduzido extracelular de protease muito alcalina, caracterizado por compreender

- isolar-se um gene, incluindo as suas regiões 5' e/ou 3' não codificantes que codifica uma protease muito alcalina,
- inserir-se o gene num vector de clonação,
- suprimir-se a região codificante do gene do vector de clonação,
- transformar-se uma estirpe de Bacillus com o vector de clonação,
- desenvolver-se os transformantes em condições em que a fun-

- 31 -

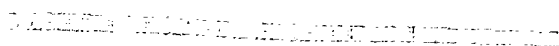
- ção de replicação do vector está inactiva, e
- seleccionar-se transformantes que perderam a sequência de ADN que codifica a protease alcalina.

- 13a -

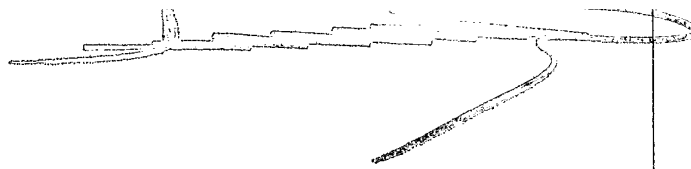
Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por a mencionada estirpe de Bacillus alcalofílica ser Bacillus novo especies PB92 ou um seu derivado.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente europeia apresentado em 11 de Agosto de 1989, sob o Nº. 89202117.1.

Lisboa, 10 de Agosto de 1990.







RESUMO

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES MUTANTES"

A invenção refere-se a um processo para a produção de proteases mutantes que diferem das proteases do tipo natural em pelo menos um aminoácido, que compreende a utilização de uma estirpe de Bacillus alcalofílica homóloga como hospedeiro de expressão, sendo a referida estirpe incapaz de produzir a protease do tipo natural.

(

(

•
•
•

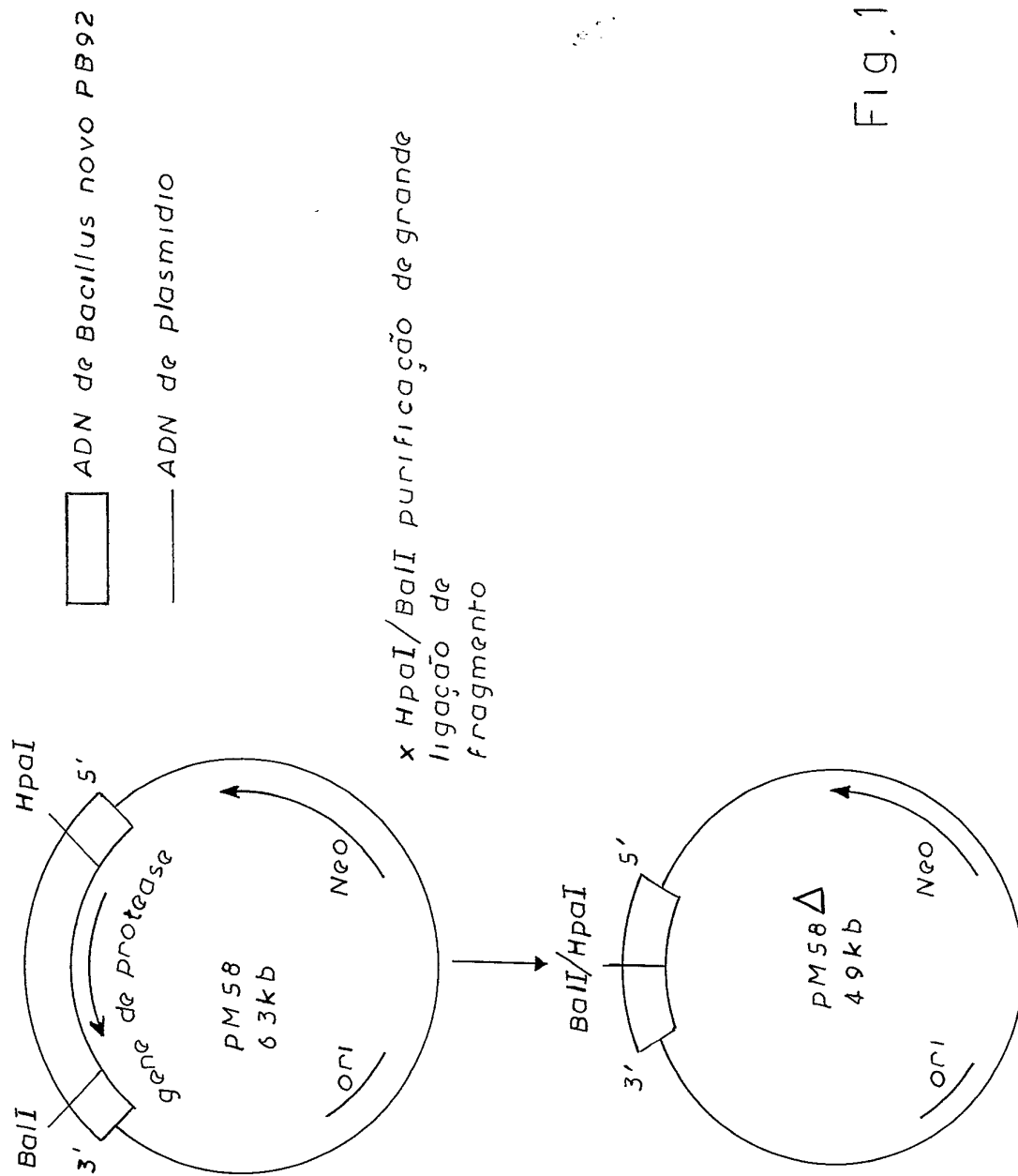
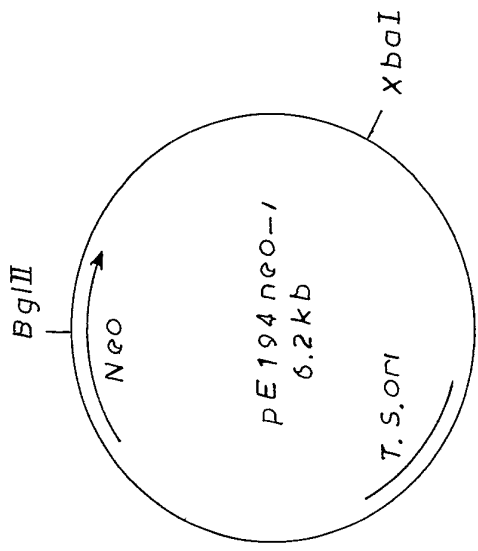


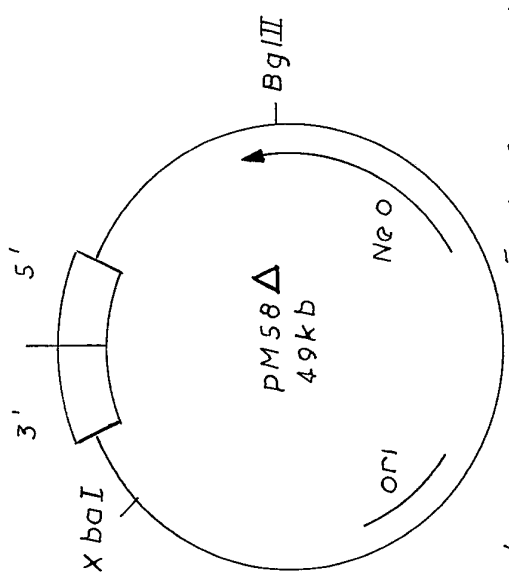
Fig.1





x XbaI/BglII purificação do fragmento de ADN contendo o origem sensível à temperatura

Ligação
Transformação para *B. subtilis* D B104
Seleção: Neo^r



x XbaI/BglII purificação do fragmento contendo ADN de *Bacillus* novo

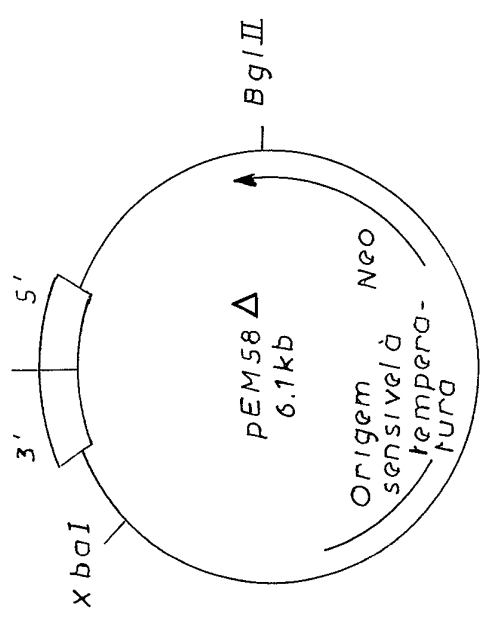


Fig.2

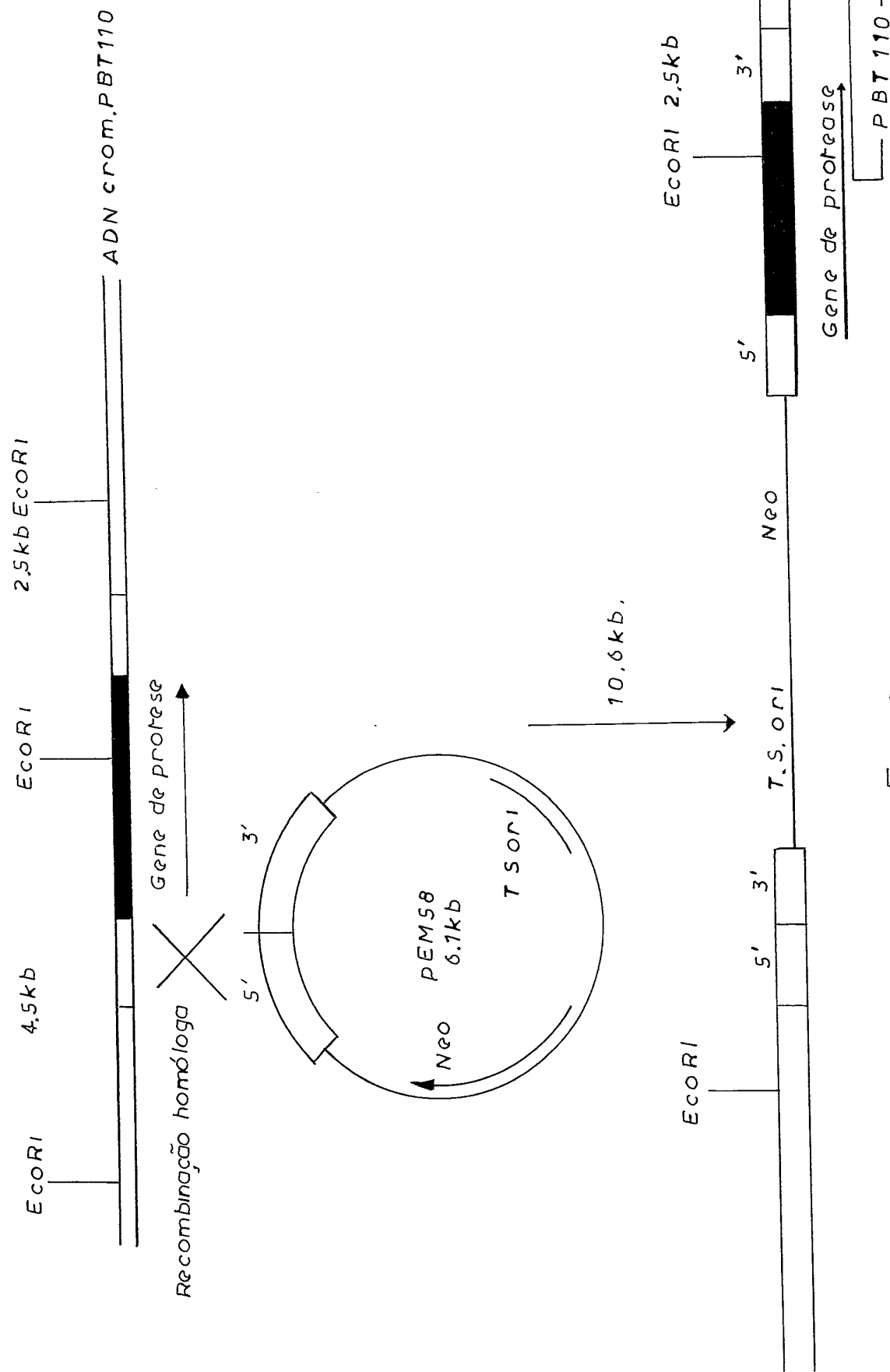
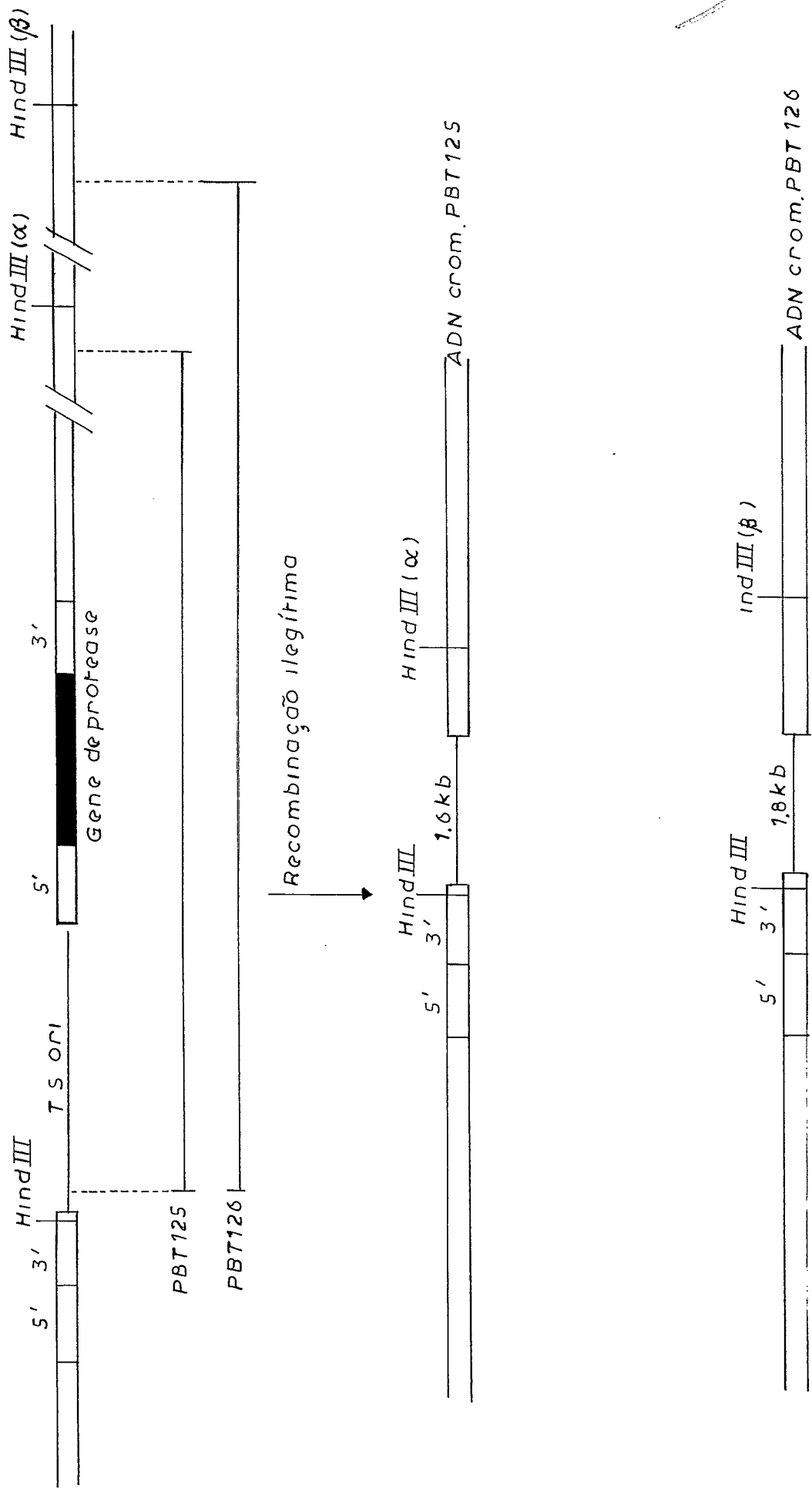


Fig.3

Fig. 4



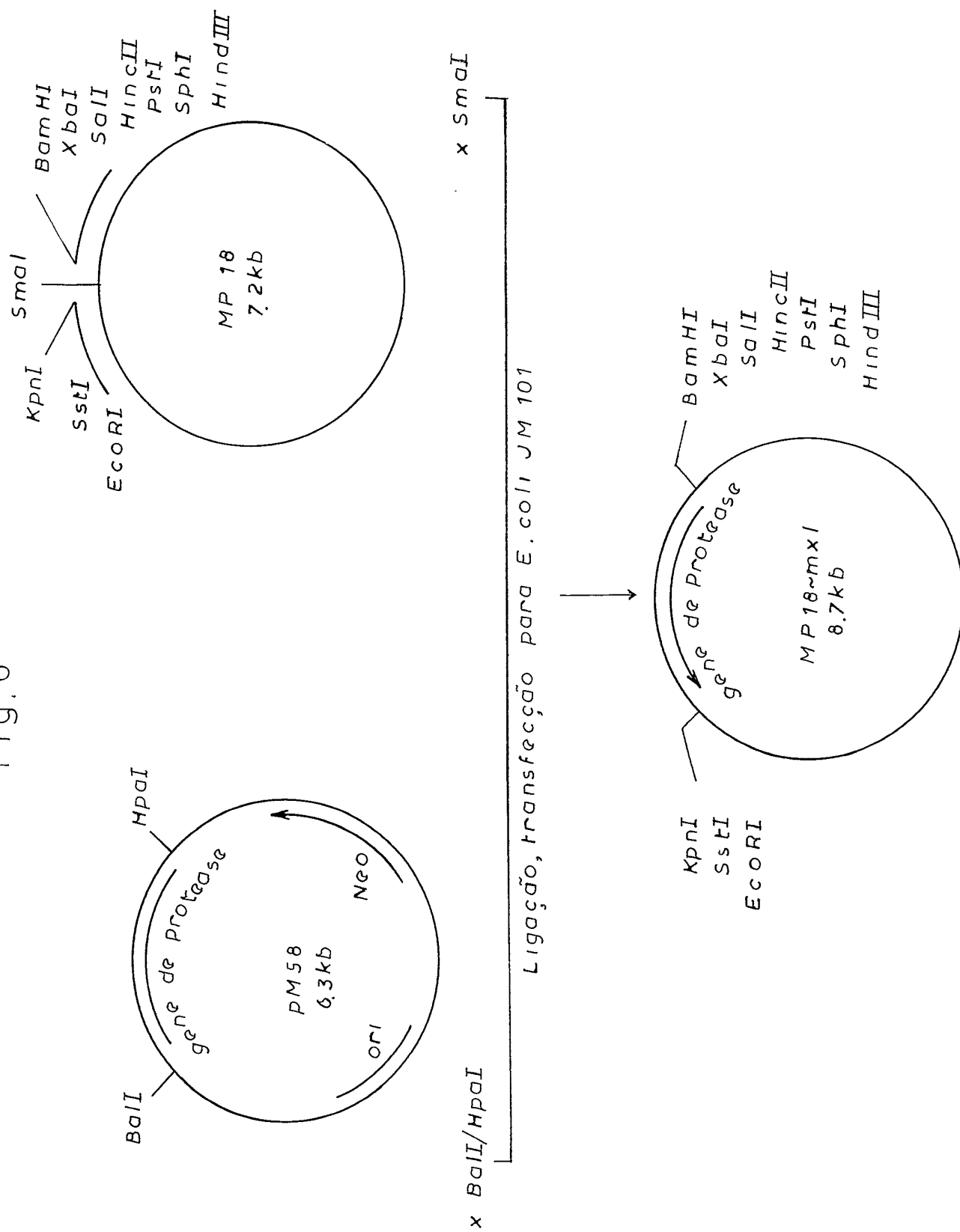
HindIII 40 80
 AAGCTTTTCAAATGATCCAGGAGAACAAAAACGATTTTTTTGAGGAAAGTTATAAATTATTTTCCGAACGATATGGCAAGC
 120 160
 AAAATATTGCTTATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCCTATGCGTGATGGA
 200 240
 AAAGTCAAGGAAAAAATGTGTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAAGATAAATTCCTCCGAGCATATGAAAAACA
 280 320
 GGGTTTTGAGTTGAAGCGTGGTGAACGTGGCTCTGACCGTAAACATATTGAGACAGCTAAATTTAAAAACAAACTTTGG
 360 400
 XbaI
 AAAAGAGATTGATTTTCTAGAAAAATGAATACGGTAAGGAAAAATATGCTGTATGCGACTGTCCATCTGGATGAAAGAGTC
 440 480
 CCACATATGCACTTTGGTTTTGTCCCTTTAACAGAGGACGGGAGATTGTCTGCAAAGAACAGTTAGGCAACAAGAAAGA
 520 560
 CTTTACTCAATTACAAGATAGATTTAATGAGTATGTGAATGAGAAAGGTTATGAACTTGAAAGAGGCACGTCCAAAGAGG
 600 640
 TTACAGAACGAGAACATAAAGCGATGGATCAGTACAAGAAAGATACTGTATTTTCATAAACAGGAACTGCAAGAAGTTAAG
 680 720
 GATGAGTTACAGAAGGCAAATAAGCAGTTACAGAGTGAATAGAGCATATGAGGTCTACGAAACCCTTTGATTATGAAAA
 760 800
 TGAGCGTACAGGTTTGTCTCTGACGTGAAGAGACTGGTAGAAAGATATTAAGTCTGATGAATTTGAACGCCTGCAAG
 840 880
 PstI
 AAACAATCTCTTCTGCAGAACGGATTGTTGATGATTACGAAAAATATTAAGAGCACAGACTATTACACAGAAAAATCAAGAA
 920 960
 TTAAAAAACGTAGAGAGAGTTTGAAAGAAGTAGTGAATACATGGAAGAGGGGTATCACGAAAAAGTAAAGAGGTTAA
 1000 1040
 TAAATTAAAGCGAGAGAATGATAGTTTGAATGAGCAGTTGAATGTATCAGAGAAATTTCAAGCTAGTACAGTGACTTTAT
 1080 1120
 ATCGTGCTGCGAGGGCGAATTTCCCTGGGTTTGAGAAAGGGTTTAATAGGCTTAAAGAGAAATCTTTAATGATTCCAAA
 1160 1200
 TTTGAGCGTGTGGGACAGTTTATGGATGTTGTACAGGATAATGTCCAGAAGGTCGATAGAAAGCGTGAGAAACAGCGTAC
 1240 1280
 AGACGATTTAGAGATGTAGAGGTACTTTTATGCCGAGAAAACTTTTTGCGTGTGACAGTCCTTAAATATACTTAGAGCG
 1320 1360
 TAAGCGAAAGTAGTAGCGACAGCTATTAACCTTCGGTTGCAAAGCTCTAGGATTTTAAATGGACGCAGCGCATCACACGC
 1400 1440
 AAAAGGAAATTGGAATAAATGCGAAATTTGAGATGTTAATTAAGACCTTTTTGAGGTCTTTTTTTCTTAGATTTTTTG
 1520 1600
 GGTATTTAGGGGAGAAAAACATAGGGGGTACTACGACCAAAATGGAGGAATACGGCAGCGGAGCATGGTGGATGCTTG
 1560 1600
 AATTTCTAGGCAACAACAACGCCGCTATTCTTGACGGTGGGATTTCAGGCTTGAAGAACAGTGGCTACCCGACAACGGGA
 HindIII
 TGAGGTGAAGCTT

Fig. 5A

HindIII 40 80
AAGCTTTTCAAATGATCCAGGAGAACAAAAACGATTTTTTTGAGGAAAGTTATAAATTATTTTCCGAACGATATGGCAAGC
 120 160
 AAAATATTGCTTATGCAACAGTTCATAATGATGAGCAAACCCCTCACATGCATTTAGGTGTTGTGCCTATGCGTGATGGA
 200 240
 AAAGTCAAGGAAAAAATGTGTTTAATCGTCAAGAACTGTTATGGCTACAAGATAAATTCCCCGAGCATATGAAAAACA
 280 320
 GGGTTTTGAGTTGAAGCGTGGTGAACGTGGCTCTGACCGTAAACATATTGAGACAGCTAAATTTAAAAACAAACTTTGG
 XbaI 360 400
 AAAAAGAGATTGATTTTCTAGAAAATGAATACGGTAAGGAAAATATGCTGTATGCGACTGTCCATCTGGATGAAAGAGTC
 440 480
 CCACATATGCACTTTGGTTTTGTCCCTTTAACAGAGGACGGGAGATTGTCTGCAAAAGAACAGTTAGGCAACAAGAAAGA
 520 560
 CTTTACTCAATTACAAGATAGATTTAATGAGTATGTGAATGAGAAAGGTTATGAACTTGAAAGAGGCACGTCCAAAGAGG
 600 640
 TTACAGAACGAGAACATAAAGCGATGGATCAGTACAAGAAAGATACTGTATTTTATAAACAGGAAGTGAAGAAAGTTAAG
 680 720
 GATGAGTTACAGAAGGCAAATAAGCAGTTACAGAGTGGAATAGAGCATATGAGGTCTACGAAACCTTTGATTATGAAAA
 760 800
 TGAGCGTACAGGTTTGTCTCTGGACGTGAAGAGACTGGTAGAAAGATATTAAGTCTGATGAATTTGAACGCCTGCAAG
 PstI 840 880
 AAACAATCTCTTCTGCAGAACGGATTGTTGATGATTACGAAAATATTAAGAGCACAGACTATTACACAGAAAATCAAGAA
 920 960
 TTAAAAAACGTAGAGAGAGTTTGAAAGAAGTAGTGAATACATGGAAAGAGGGGTATCACGAAAAAGTAAAGAGGTTAA
 1000 1040
 TAAATTAAAGCGAGAGAATGATAGTTTGAATGAGCAGTTGAATGTATCAGAGAAATTTCAAGCTAGTACAGTGACTTTAT
 1080 1120
 ATCGTGCTGCGAGGGCGAATTTCCCTGGGTTTGAGAAAGGGTTTAATAGGCTTAAAGAGAAATTCITTAATGATTCCAAA
 1160 1200
 TTTGAGCGTGTGGGACAGTTTATGGATGTTGTACAGGATAATGTCCAGAAGGTCGATAGAAAGCGTGAGAAACAGCGTAC
 1240 1280
 AGACGATTTAGAGATGTAGAGGTACTTTTATGCCGAGAAAACCTTTTTGCGTGTGACAGTCCTTAAATATACTTAGAGCG
 1320 1360
 TAAGCGAAAGTAGTAGCGACAGCTATTAACCTTTCGGTTGCAAAGCTCTAGGATTTTAAATGGACGCAGCGCATCACACGC
 1400 1440
 AAAAAGGAAATTGGAATAAATGCGAAATTTGAGATGTTAATTAAAGACCTTTTTGAGGTCTTTTTTCTTAGATTTTTGG
 plasm.seq. chrom.seq. 1520
 GGTATTTAGGGGAGAAAACATAGGGGGTACTACGACCATTACGGAGAACGCAAAGCAGTAATCTCTGTAGTGTATTGA
 1560 1600
 AGCAGG.....CA.100BP.....TTCAGTCCGTCAAGAGATGCGCAACTACGATAACTCCATTCTTTATGGTATGGCTG
 1640 1680
 AGAAAAATAGCGATTATGAACGTCGTTGGCGGTACATTTACCGACGAGCCATATGGGGATTGCTGTCCGCAACCGCGACG
 EcoRI 1720 HindIII
ACGAATTCACGCGAAAAAATCAATGAAATCTTTCGAGACTTAAAGCTT

Fig. 5 B

Fig. 6



Sequência de pBHA

AATTCACCTC GAAAGCAAGC TGATAAACCG ATACAATTAA AGGCTCCTTT TGGAGCCTTT 30 60
 TTTTTTGGAG ATTTTCAACG TGAAAAAATT ATTATTCGCA ATTCCAAGCT AATTCACCTC 90 120
 GAAAGCAAGC TGATAAACCG ATACAATTAA AGGCTCCTTT TGGAGCCTTT TTTTTTGGAG 150 180
 ATTTTCAACG TGAAAAAATT ATTATTCGCA ATTCCAAGCT CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG 210 240
 ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTCACAGCT TGTCTGTAAG 270 300
 CGGATGCAGA TCACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC GGCGGGTGTG GTGGTTACGC 330 360
 GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT 390 420
 CCTTCTCGC CACGTTCCGC GGCTTTCGCC GTCAAGCTCT AAATCGGGGG CTCCCTTTAG 450 480
 GGTTCGGATT TAGTGCTTTA CGGCACCTCG ACCCCAAAAA ACTTGATTAG GGTGATGGTT 510 540
 CACGTAGTGG GCCATCGCCC TGATAGACGG TTTTTCGCCC TTTGACGTTG GAGTCCACGT 570 600
 TCTTTAATAG TGGACTCTTG TTCCAAACTG GAACAACACT CAACCCTATC TCGGTCTATT 630 660
 CTTTGTGATT ATAAGGGATT TTGCCGATTT CGGCCTATTG GTTAAAAAAT GAGCTGATTT 690 720
 AACAAAAATT TAACGCGAAT TTTAACAAAA TATTAACGTT TACAATTTGA TCTGCGCTCG 750 780
 GTCGTTCCGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA 810 840
 GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC 870 900
 CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CGAGCATCAC 930 960
 AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG 990 1020
 TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC 1050 1080

1110 1140
 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC AATGCTCACG CTGTAGGTAT
 1170 1200
 CTCAGTTCCG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTCAG
 1230 1260
 CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC
 1290 1320
 TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT
 1350 1380
 GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
 1410 1440
 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC
 1470 1500
 AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA
 1530 1560
 AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC
 1590 1620
 GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC
 1650 1680
 CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
 1710 1740
 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTGTTCA
 1770 1800
 TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT
 1830 1860
 GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA
 1890 1920
 ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC
 1950 1980
 ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
 2010 2040
 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT
 2070 2100
 TCATTGAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA
 2130 2160
 AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA
 2190 2220
 TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC

2250 2280
 TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2310 2340
 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA
 2370 2400
 GTGCTCATCA TTGAAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG
 2430 2460
 AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTT
 2490 2520
 ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG
 2550 2580
 GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCAGACAG
 2610 2640
 TTTTATTGTT CATGATGATA TATTTTATC TTGTGCAATG TAACATCAGA GATTTTGAGA
 2670 2700
 CACAACGTGG CTTTGTGAA TAAATCGAAC TTTTGCTGAG TTGACTCCCC GCGCGCGATG
 2730 2760
 GGTCGAATTT GCTTTCGAAA AAAAAGCCCG CTCATTAGGC GGGCTAAAAA AAAGCCCGT
 2790 2820
 CATTAGGCGG GCTCGAATTT CTGCCATTCA TCCGCTTATT ATCACTTATT CAGGCGTAGC
 2850 2880
 AACCAGGCGT TTAAGGGCAC CAATAACTGC CTAAAAAAA TTACGCCCCG CCCTGCCACT
 2910 2940
 CATCGCAGTA CTGTTGTAAT TCATTAAGCA TTCTGCCGAC ATGGAAGCCA TCACAGACGG
 2970 3000
 CATGATGAAC CTGAATCGCC AGCGGCATCA GCACCTTGTC GCCTTGCGTA TAATATTG
 3030 3060
 CCATAGTGAA AACGGGGGCG AAGAAGTTGT CCATATTCGC CACGTTTAAA TCAAACTGG
 3090 3120
 TGAAACTCAC CCAGGGATTG GCTGAGACGA AAAACATATT CTCAATAAAC CCTTTAGGGA
 3150 3180
 AATAGGCCAG GTTTTCACCG TAACACGCCA CATCTTGCGA ATATATGTGT AGAAACTGCC
 3210 3240
 GGAAATCGTC GTGGTATTCA CTCCAGAGCG ATGAAAACGT TTCAGTTTGC TCATGGAAAA
 3270 3300
 CGGTGTAACA AGGGTGAACA CTATCCATA TCACCAGCTC ACCGTCTTTC ATTGCCATAC
 3330 3360
 GAAATTCCGG ATGAGCATTG ATCAGGCGGG CAAGAATGTG AATAAAGGCC GGATAAACT

3390 3420
 TGTGCTTATT TTTCTTTACG GTCTTTAAAA AGGCCGTAAT ATCCAGCTAA ACGGTCTGGT
 3450 3480
 TATAGGTACA TTGAGCAACT GACTGAAATG CCTCAAAATG TTCTTTACGA TGCCATTGGG
 3510 3540
 ATATATCAAC GGTGGTATAT CCAGTGATTT TTTTCTCCAT TTTAGCTTCC TTAGCTCCTG
 3570 3600
 AAAATCTCGA TAACTCAAAA AATACGCCCC GTAGTGATCT TATTTCATTA TGGTGAAAGT
 3630 3660
 TGGAACCTCT TACGTGCCGA TCAACGTCTC ATTTTCGCCA AAAGTTGGCC CAGGGCTTCC
 3690 3720
 CGGTATCAAC AGGGACACCA GGATTTATTT ATTCTGCGAA GTGATCTTCC GTCACAGGTA
 3750 3780
 TTTATTTCGAA GACGAAAGGG CATCGCGCGC GGGGAATTCC CGGGAGAGCT CGATATCGCA
 3810 3840
 TGCGGTACCT CTAGAAGAAG CTTGGAGACA AGGTAAAGGA TAAAACAGCA CAATTCCAAG
 3870 3900
 AAAAACACGA TTTAGAACCT AAAAAGAACG AATTTGAACT AACTCATAAC CGAGAGGTAA
 3930 3960
 AAAAAGAACG AAGTCGAGAT CAGGGAATGA GTTTATAAAA TAAAAAAGC ACCTGAAAAG
 3990 4020
 GTGTCTTTTT TTGATGGTTT TGAACITGTT CTTTCTTATC TTGATACATA TAGAAATAAC
 4050 4080
 GTCATTTTTA TTTTAGTTGC TGAAAGGTGC GTTGAAGTGT TGGTATGTAT GTGTTTTAAA
 4110 4140
 GTATTGAAAA CCCTTAAAT TGGTGCACA GAAAAACCCC ATCTGTAAAA GTTATAAGTG
 4170 4200
 ACTAAACAAA TAACTAAATA GATGGGGGTT TCTTTTAATA TTATGTGTCC TAATAGTAGC
 4230 4260
 ATTTATTCAG ATGAAAAATC AAGGGTTTTA GTGGACAAGA CAAAAAGTGG AAAAGTGAGA
 4290 4320
 CCATGGAGAG AAAAGAAAAT CGCTAATGTT GATTACTTTG AACTTCTGCA TATTCTTGAA
 4350 4380
 TTTAAAAAGG CTGAAAGAGT AAAAGATTGT GCTGAAATAT TAGAGTATAA ACAAATCGT
 4410 4440
 GAAACAGGCG AAAGAAAGTT GTATCGAGTG TGGTTTTGTA AATCCAGGCT TTGTCCAATG
 4470 4500
 TGCAACTGGA GGAGAGCAAT GAAACATGGC ATTCAGTCAC AAAAGGTTGT TGCTGAAGTT

4530 4560
 ATTAACAAA AGCCAACAGT TCGTTGGTTG TTTCTCACAT TAACAGTTAA AAATGTTTAT
 4590 4620
 GATGGCGAAG AATTAAATAA GAGTTTGTCA GATATGGCTC AAGGATTTCTG CCGAATGATG
 4650 4680
 CAATATAAAA AAATTAATAA AAATCTTGTT GGTTTTATGC GTGCAACGGA AGTGACAATA
 4710 4740
 AATAATAAAG ATAATTCTTA TAATCAGCAC ATGCATGTAT TGGTATGTGT GGAACCAACT
 4770 4800
 TATTTTAAGA ATACAGAAAA CTACGTGAAT CAAAAACAAT GGATTCAATT TTGAAAAAAG
 4830 4860
 GCAATGAAAT TAGACTATGA TCCAAATGTA AAAGTTCAAA TGATTCGACC GAAAAATAAA
 4890 4920
 TATAAATCGG ATATACAATC GGCAATTGAC GAAACTGCAA AATATCCTGT AAAGGATACG
 4950 4980
 GATTTTATGA CCGATGATGA AGAAAAGAAT TTGAAACGTT TGTCTGATTT GGAGGAAGGT
 5010 5040
 TTACACCGTA AAAGGTTAAT CTCCTATGGT GGTTTGTAA AAGAAATACA TAAAAAATTA
 5070 5100
 AACCTTGATG ACACAGAAGA AGGCGATTTG ATTCATACAG ATGATGACGA AAAAGCCGAT
 5130 5160
 GAAGATGGAT TTTCTATTAT TGCAATGTGG AATTGGGAAC GGAAAAATTA TTTTATTAAA
 5190 5220
 GAGTAGTTCA ACAAACGGGC CAGTTTGTTG AAGATTAGAT GCTATAATTG TTATTAATAAG
 5250 5280
 GATTGAAGGA TGCTTAGGAA GACGAGTTAT TAATAGCTGA ATAAGAACGG TGCTCTCCAA
 5310 5340
 ATATTCTTAT TTAGAAAAGC AAATCTAAAA TTATCTGAAA AGGGAATGAG AATAGTGAAT
 5370 5400
 GGACCAATAA TAATGACTAG AGAAGAAAGA ATGAAGATTG TTCATGAAAT TAAGGAACGA
 5430 5460
 ATATTGGATA AATATGGGGA TGATGTAAAG GCTATTGGTG TTTATGGCTC TCTTGGTCGT
 5490 5520
 CAGACTGATG GGCCCTATTC GGATATTGAG ATGATGTGTG TCATGTCAAC AGAGGAAGCA
 5550 5580
 GAGTTCAGCC ATGAATGGAC AACCGGTGAG TGGAAGGTGG AAGTGAATTT TGATAGCGAA
 5610 5640
 GAGATTCTAC TAGATTATGC ATCTCAGGTG GAATCAGATT GGCCGCTTAC ACATGGTCAA

5670 5700
 TTTTCTCTA TTTTGCCGAT TTATGATTCA GGTGGATACT TAGAGAAAAGT GTATCAAACCT
 5730 5760
 GCTAAATCGG TAGAAGCCCA AACGTTCCAC GATGCGATTT GTGCCCTTAT CGTAGAAGAG
 5790 5820
 CTGTTTGAAT ATGCAGGCAA ATGGCGTAAT ATTTCGTGTGC AAGGACCGAC AACATTTCTA
 5850 5880
 CCATCCTTGA CTGTACAGGT AGCAATGGCA GGTGCCATGT TGATTGGTCT GCATCATCGC
 5910 5940
 ATCTGTTATA CGACGAGCGC TTCGGTCTTA ACTGAAGCAG TTAAGCAATC AGATCTTCCT
 5970 6000
 TCAGGTTATG ACCATCTGTG CCAGTTCGTA ATGTCTGGTC AACTTTCCGA CTCTGAGAAA
 6030 6060
 CTTCTGGAAT CGCTAGAGAA TTTCTGGAAT GGGATTCAGG AGTGGACAGA ACGACACGGA
 6090 6120
 TATATAGTGG ATGTGTCAAA ACGCATACCA TTTTGAACGA TGACCTCTAA TAATTGTTAA
 6150 6180
 TCATGTTGGT TACGTATTTA TTAACCTCTC CTAGTATTAG TAATTATCAT GGCTGTCATG
 6210 6240
 GCGCATTAAC GGAATAAAGG GTGTGCTTAA ATCGGGCCAT TTTGCGTAAT AAGAAAAAGG
 6270 6300
 ATTAATTATG AGCGAATTGA ATTAATAATA AGGTAATAGA TTTACATTAG AAAATGAAAG
 6330 6360
 GGGATTTTAT GCGTGAGAAT GTTACAGTCT ATCCCGGCAT TGCCAGTCGG GGATATTAAA
 6390 6420
 AAGAGTATAG GTTTTTATTG CGATAAACTA GGTTCACCTT TGGTTCACCA TGAAGATGGA
 6450 6480
 TTCGCAGTTC TAATGTGTAA TGAGGTCGG ATTATCTAT GGGAGGCAAG TGATGAAGGC
 6510 6540
 TGGCGCTCTC GTAGTAATGA TTCACCGGTT TGTACAGGTG CGGAGTCGTT TATTGCTGGT
 6570 6600
 ACTGCTAGTT GCCGCATTGA AGTAGAGGGA ATTGATGAAT TATATCAACA TATTAAGCCT
 6630 6660
 TTGGGCATTT TGCACCCCAA TACATCATTA AAAGATCAGT GGTGGGATGA ACGAGACTTT
 6690 6720
 GCAGTAATTG ATCCCGACAA CAATTGATT AGCTTTTTTC AACAAATAAA AAGCTAAAT
 6750 6780
 CTATTATTAA TCTGTTTCAGC AATCGGGCGC GATTGCTGAA TAAAAGATAC GAGAGACCTC

6810 6840
TCTTGTATCT TTTTATTTT GAGTGGTTTT GTCCGTTACA CTAGAAAACC GAAAGACAAT
6870 6900
AAAAATTTTA TTCTTGCTGA GTCTGGCTTT CGGTAAGCTA GACAAAACGG ACAAATAAA
6930 6960
AATTGGCAAG GGTTTAAAGG TGGAGATTTT TTGAGTGATC TTCTCAAAAA ATACTACCTG
6990 7020
TCCCTTGCTG ATTTTAAAC GAGCAGGAGA GCAAAACCCC CCTTTGCTGA GGTGGCAGAG
7050 7080
GGCAGTTTTT TTTGTTTCTT TTTTCTCGTA AAAAAAGAA AGGTCTTAAA GTTTTATGG
7110 7140
TTTTGGTCGG CACTGCCGAC AGCCTCGCAG GACACACACT TTATGAATAT AAAGTATAGT
7170 7200
GTGTTATACT TTAATTGGAA GTGGTTGCCG GAAAGAGCGA AAATGCCTCA CATTTGTGCC
7230 7260
ACCTAAAAAG GAGCGATTTA CATATGAGTT ATGCAGTTTG TAGAATGCAA AAAGTGAAAT
7290 7320
CAGGGGGATC CTCTAGAGTC GAGCTCAAGC TAGCTTGGTA CGTACCAGAT CTGAGATCAC
GCGTTCTAGA GGTCGA

Fig. 8

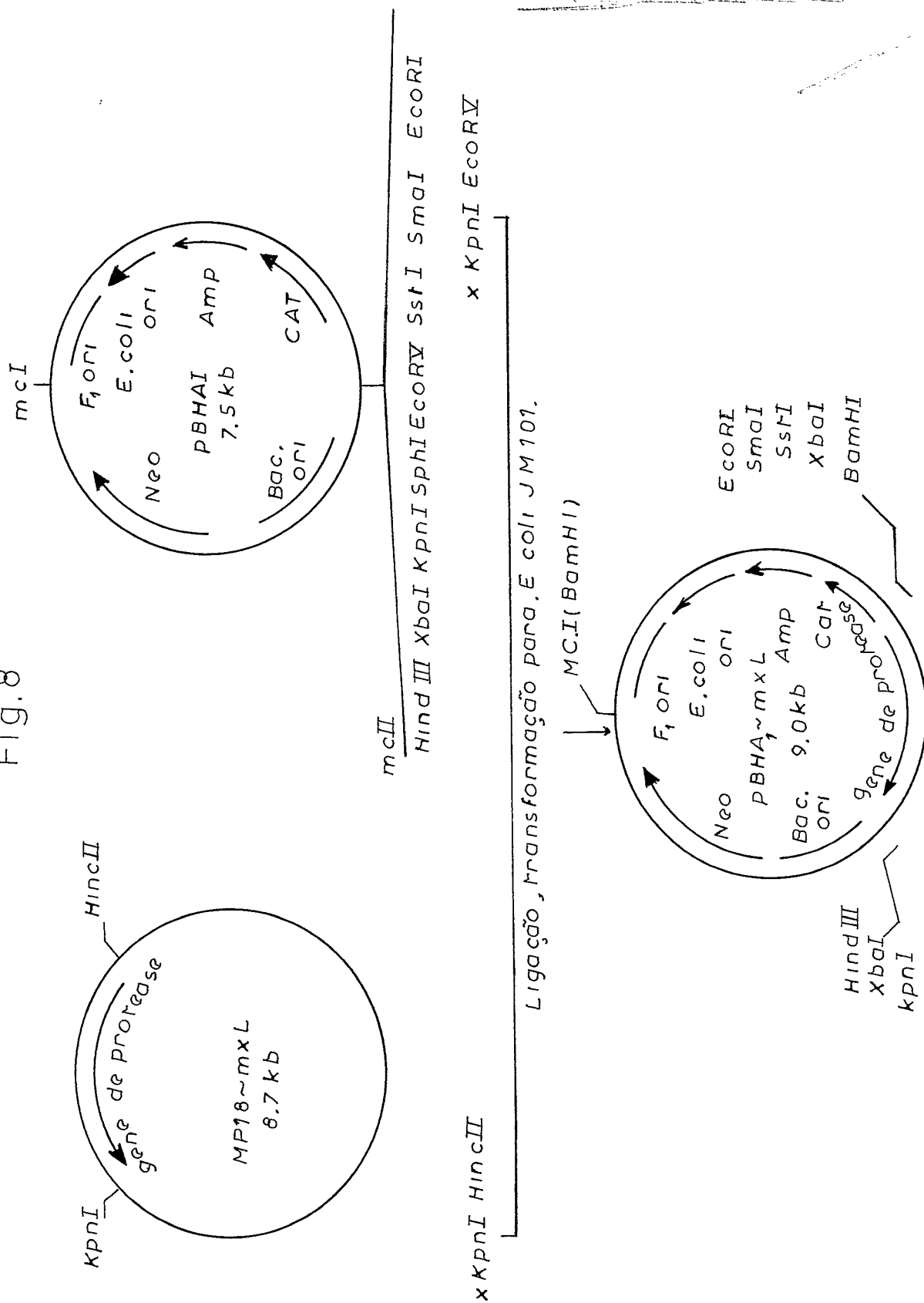


Fig.9

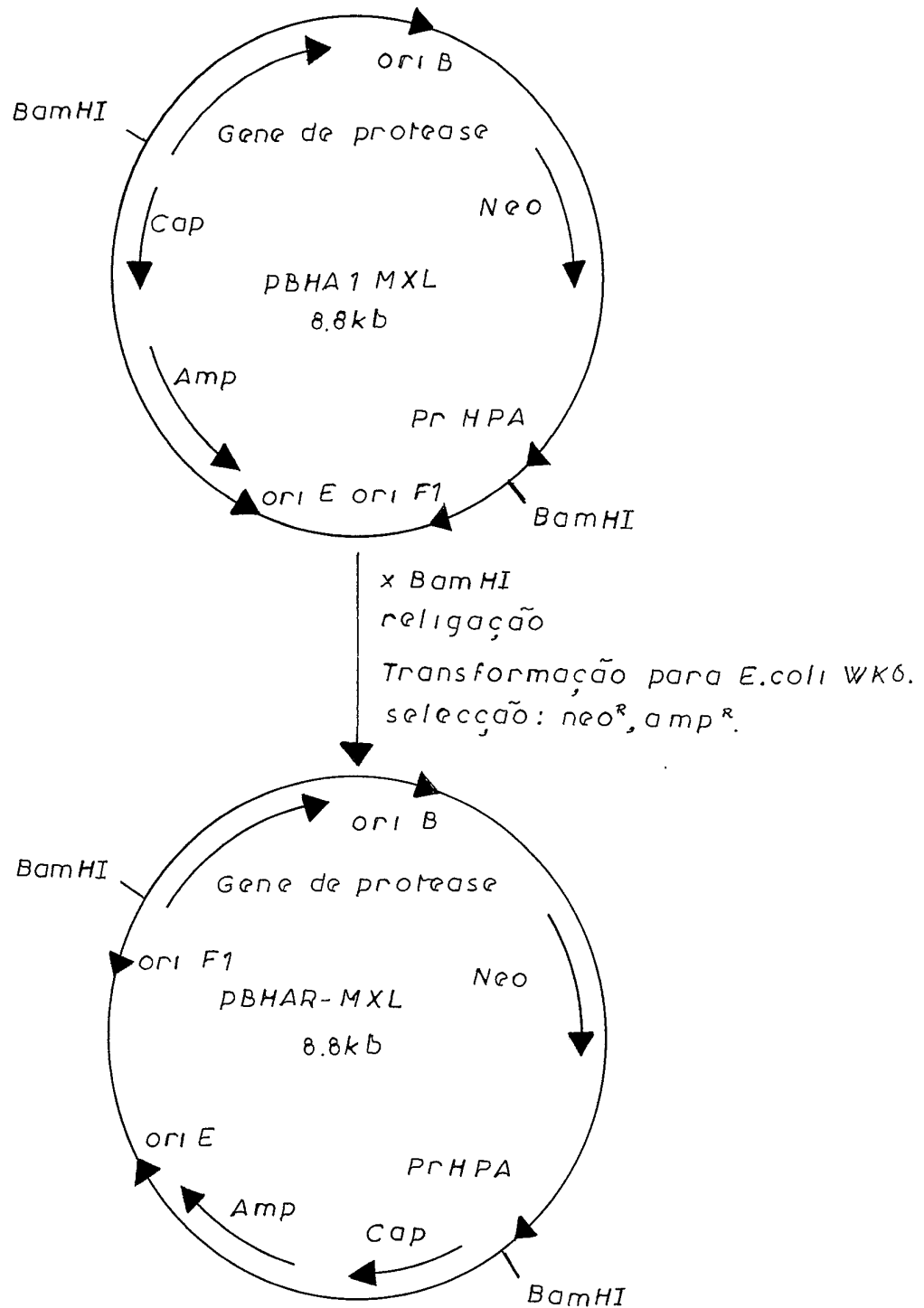
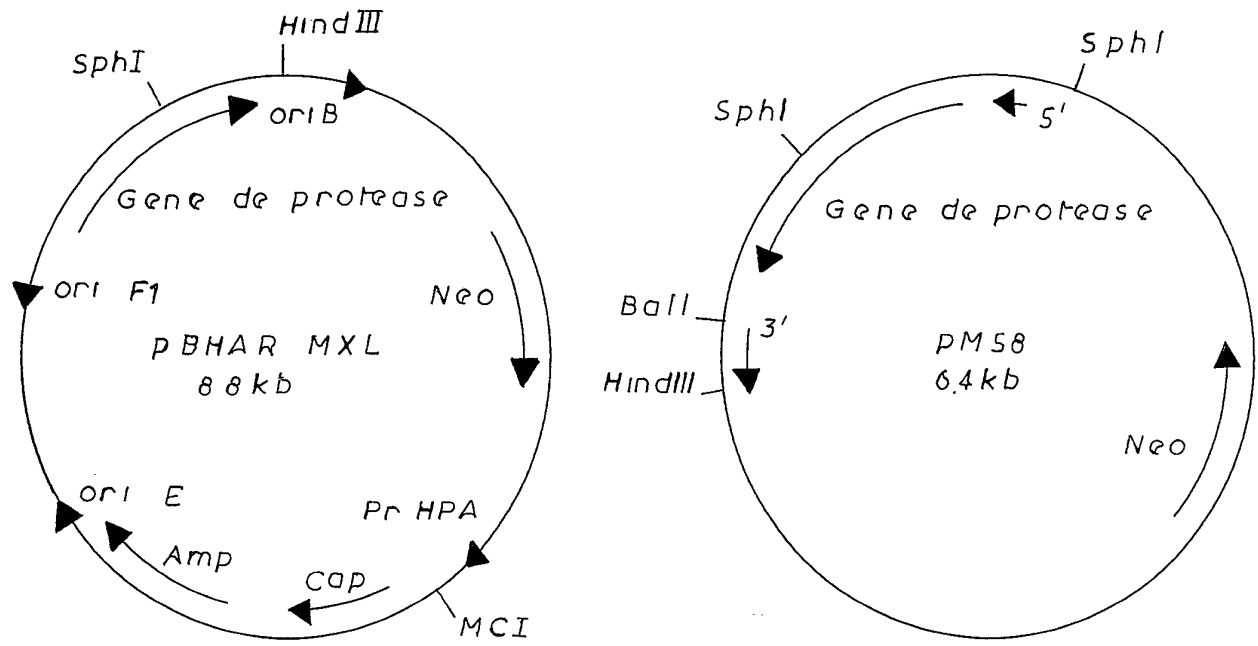


Fig.10



x *Sph I* *Hind III*
purificação do grande fragmento

x *Sph I* *Hind III*

Ligação
transformação
para *B. subtilis* DB104.
selecção: prot⁺ neo^r

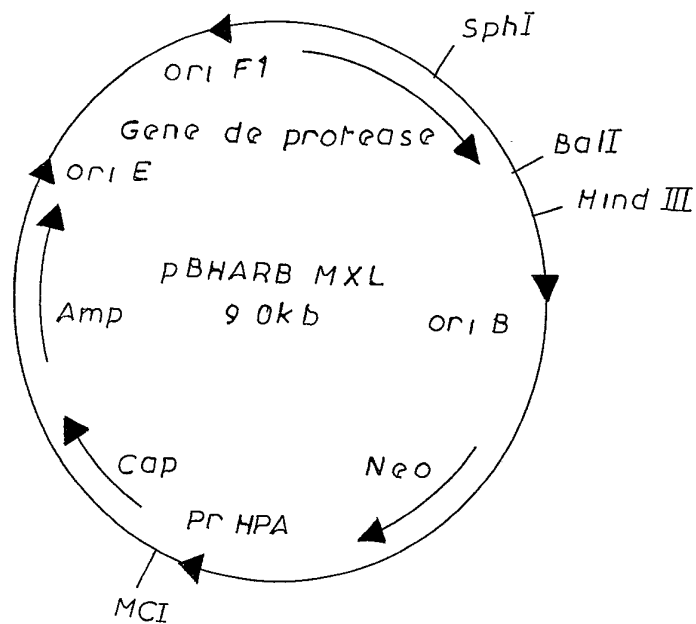


Fig. 11

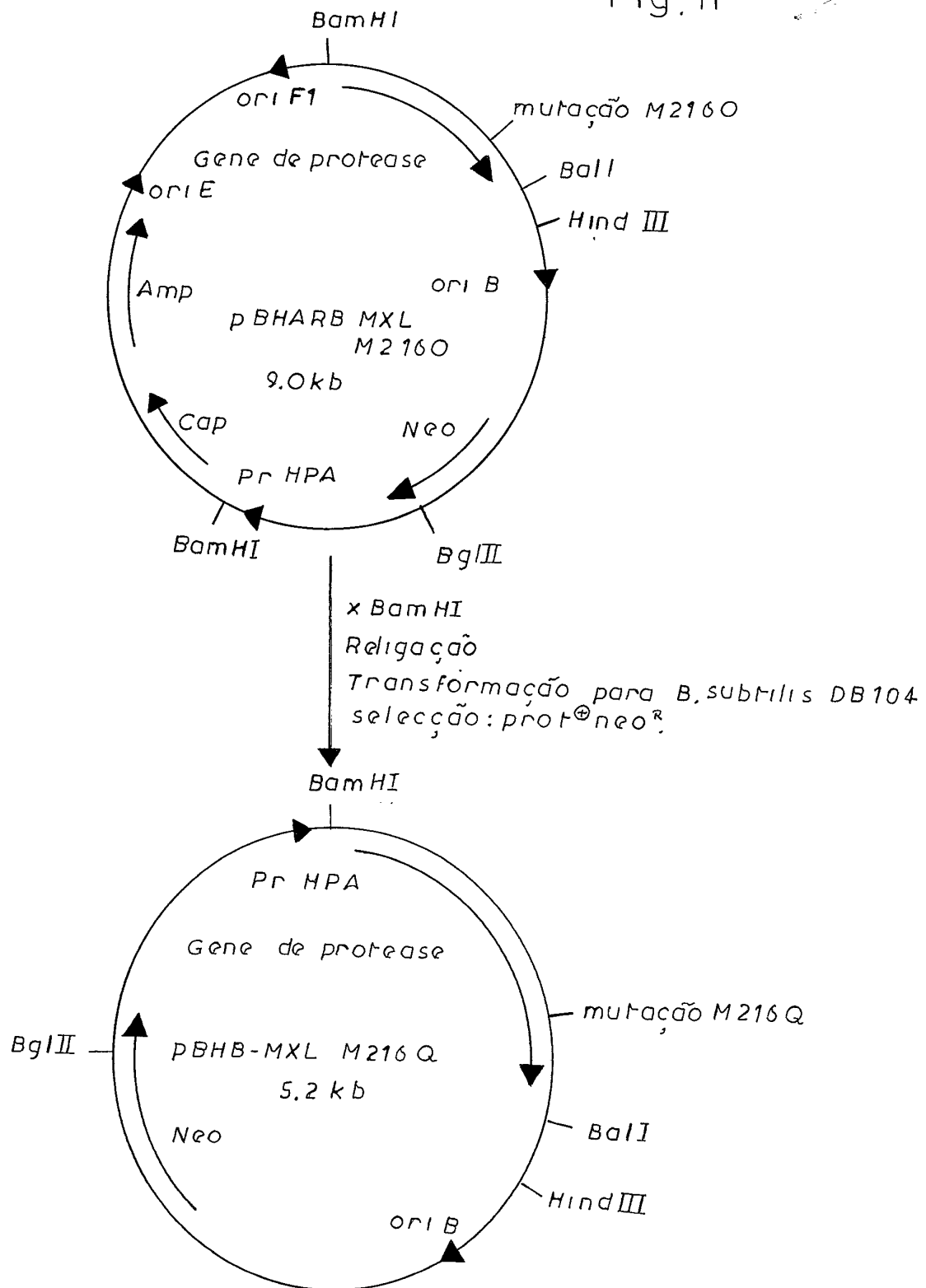


Fig. 12

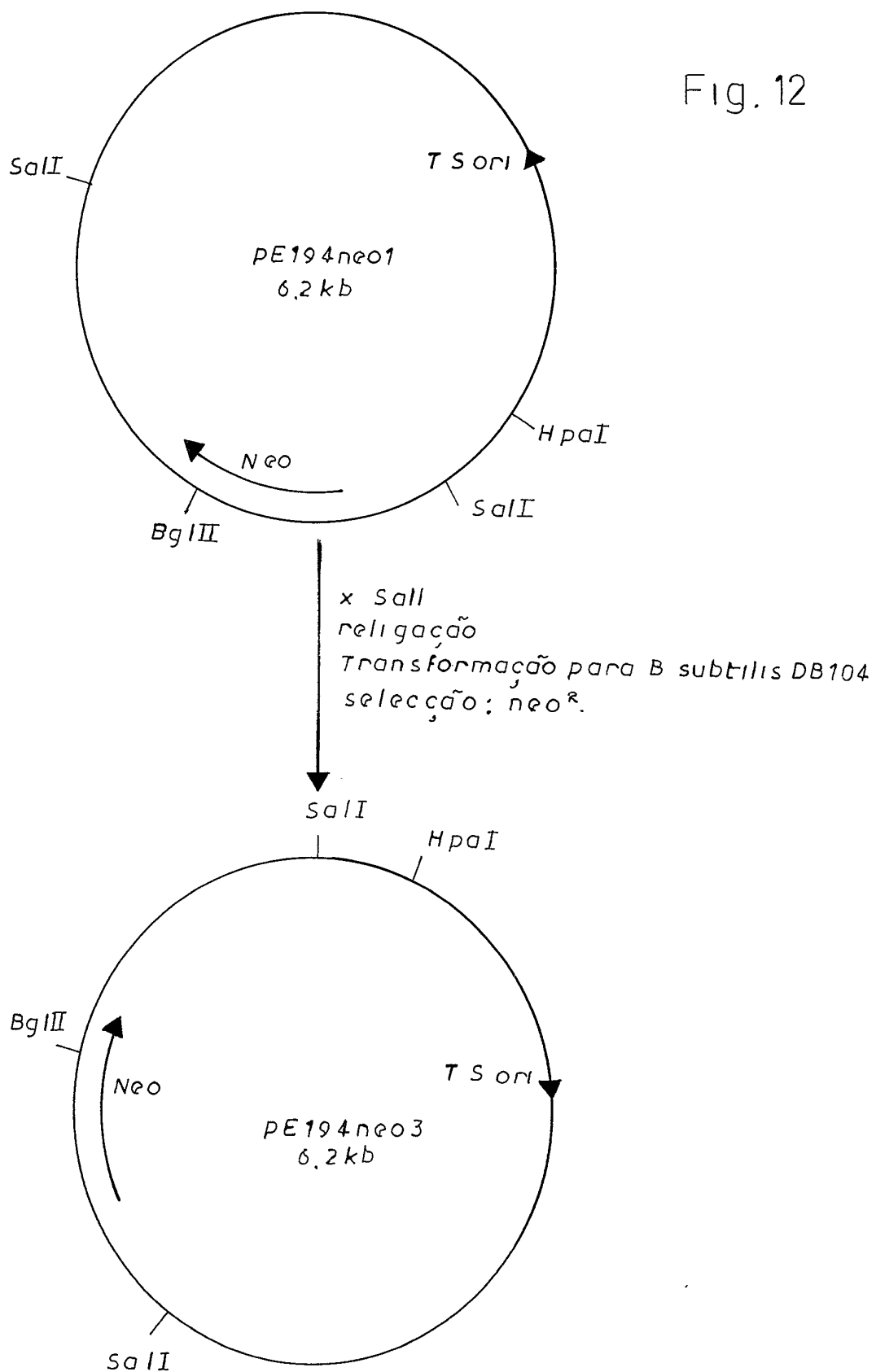


Fig. 13

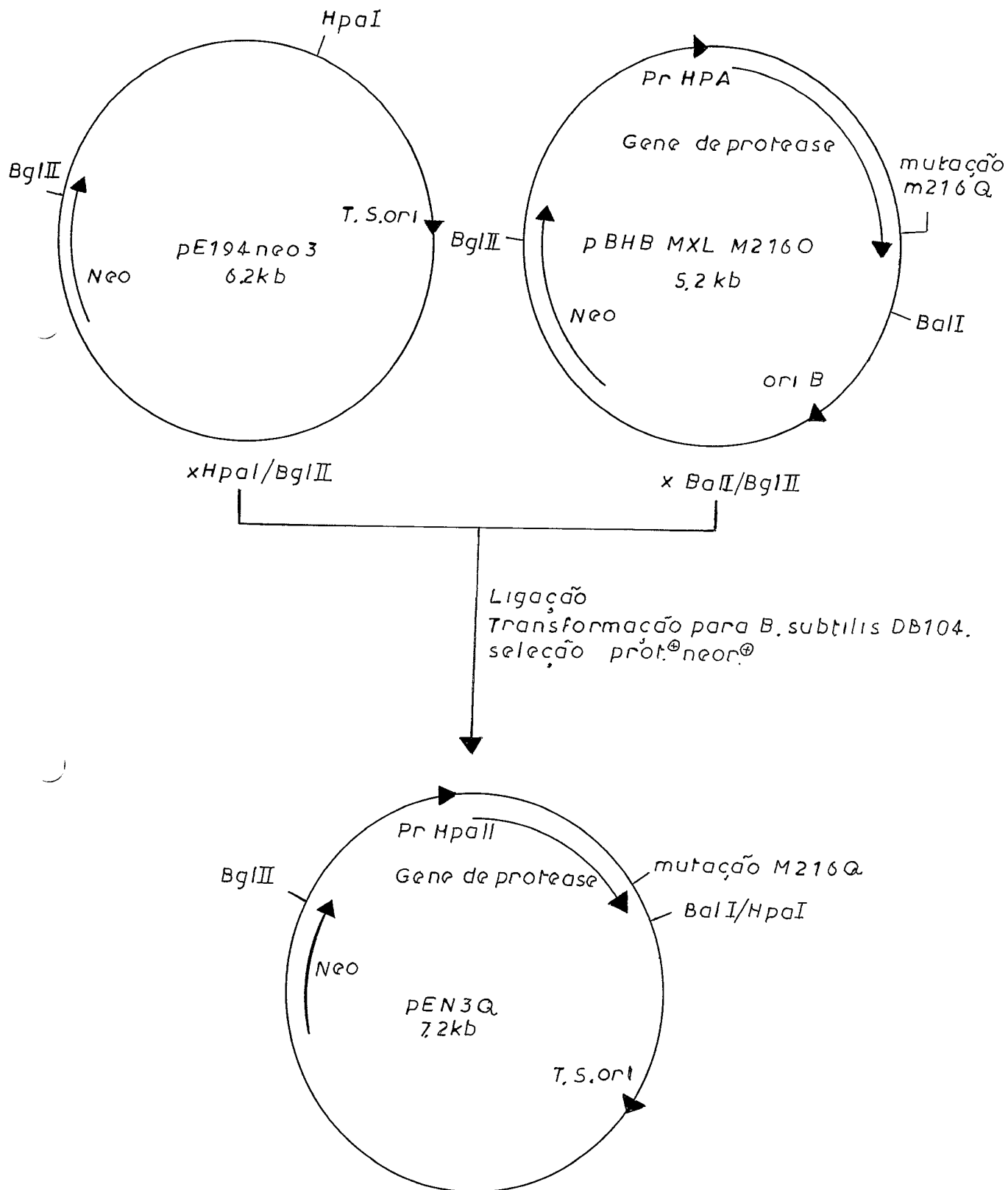


Fig.15

