



(11) *Número de Publicação:* **PT 725822 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )  
C12N015/16 A C12N015/81 B

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

(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.10.17	(73) <i>Titular(es):</i> BASF AKTIENGESELLSCHAFT CARL-BOSCH-STRASSE 38 D-67056 LUDWIGSHAFEN DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1993.10.28 DE 4336810	RHEIN BIOTECH G.FUR NEUE BIOTEC. PROZESSE PRODUKT - 40595 DUSSELDORF DE
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1996.08.14	(72) <i>Inventor(es):</i> MICHAEL J. PIORKOWSKI US JURGEN SCHWEDEN DE CLAUS BOLLSCHWEILER DE ULRIKE WEYDEMANN DE GERD GELLISSEN DE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.05.10	(74) <i>Mandatário(s):</i> MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO 201, 3º AND./ESQ. 1070 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURAS

(57) *Resumo:*

RESUMO

Processo para preparação de proteínas por recombinação em leveduras. O processo compreende a obtenção de um organismo geneticamente modificado capaz de produzir a proteína desejada, a cultura deste organismo em um meio de cultura adequado e a purificação da proteína produzida. A proteína produzida pode ser utilizada em diversas aplicações, tais como em alimentos, cosméticos, medicamentos, etc.





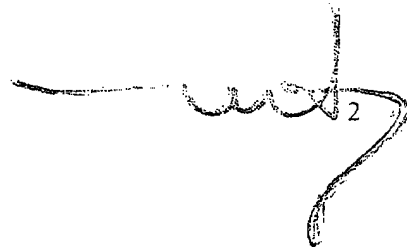
## DESCR I Ç Ã O

### "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURAS"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de proteínas por recombinação em leveduras.

A preparação de proteínas por recombinação em leveduras é conhecida. Os genes heterólogos podem ser expressos como proteínas intracelulares ou ser segregados directamente para o meio. Este último caso pressupõe que, antes da proteína heteróloga ou do gene, seja inserida por fusão uma sequência de sinal. Na *S. cerevisiae* as sequências de sinal das proteínas secretóricas genuínas para a feromona factor- $\alpha$  (Brake, A.J., et al., Natl. Acad. Sci. USA 81, 4642-4616 (1984)), a invertase (Taussig R. e Carlson M., Nucleic Acids Res. 11, 1943-1954 (1983)) e a fosfatase ácida (Meyhack B. et al., EMBO J. 1, 675-680 (1982)) foram utilizadas para a secreção de proteínas heterólogas (Kingsman S., et al., in: Russel G.E. (Ed.) Yeast Biotechnology (pp. 113-152). Intercept Ltd., Wimborne, Dorset (1988); Chiron EP 116 201).

As fusões com estes pré-pro-fragmentos conduzem também, noutras leveduras, à secreção de proteínas heterólogas, de modo que se pode partir de um mecanismo de processamento e secreção semelhante (Gellissen G. et al., Biotech. Adv. 10, 179-189 (1992); Vedvick T. et al., J. Ind. Microbiol. 7, 197-202 (1992)).



São também reconhecidas nas leveduras as sequências de sinal genuínas de uma proteína heteróloga.

Na levedura *Hansenula polymorpha* a sequência *leader* de glucoamilase (GAM1) da *Schwanniomyces occidentalis* é reconhecida como sequência de sinal e é possível segregar glucoamilase processada correctamente (G.Gellissen et al., *Biotechnology* 9, 291-295, 1991). Esta sequência de sinal, no entanto, não conduz à secreção de produtos genéticos estranhos à levedura, por exemplo, não é possível, por esta via, a secreção da proteína hirudina.

O problema da presente invenção era, por conseguinte, desenvolver um processo para a preparação de proteínas por recombinação, em especial de proteínas estranhas à levedura, isto é, de proteínas heterólogas, na levedura *Hansenula*, o qual assegura, para uma série de proteínas, a secreção eficiente e o processamento correcto.

Este problema é solucionado através de um processo para a preparação de proteínas por recombinação em leveduras, o qual é caracterizado pelo facto de a levedura ser transformada com uma "kassete" de expressão que contém, codificados, os seguintes elementos estruturais:

L - A - P - GEN

em que

- L: representa uma sequência *leader* de uma neurohormona peptídica animal,
- A: representa um adaptador que produz uma estrutura alfa-helix,
- P: representa um sinal de processamento e

GEN: representa um gene de estrutura para a proteína pretendida.

Como sequências *leader* são apropriadas todas as sequências *leader* de neurohormonas peptídicas animais. São apropriadas, em especial, as sequências *leader* que são derivadas de neurohormonas provenientes de animais invertebrados, como insectos e moluscos.

Os exemplos destas neurohormonas peptídicas animais são PBAN da lagarta do milho (Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 142-146, 1992), o peptídeo 5-KD do gafanhoto (Eur. J. Biochem. 187, 249-254, 1990), a hormona hiperglicémica do caranguejo de praia, (FEBS Letter, 257, 31-34, 1989), a vasotocina do sapo (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3043-3046, 1987).

É particularmente bem apropriada para o processo de acordo com a invenção a sequência *leader* da hormona hiperglicémica do caranguejo de praia. Consiste nos aminoácidos n.º 1 até 26 da sequência SEQ ID NO:1.

Como adaptador A são apropriadas todas as sequências que codificam para um polipeptídeo que contém uma estrutura alfa-helix. A existência de uma estrutura alfa-helix pode ser determinada de acordo com o algoritmo de Garnier et al. (J. Mol. Biol. 120, 97-120, 1978). É determinada de forma particularmente simples com programas de computador susceptíveis de obtenção comercial, que são baseados neste algoritmo, no caso de uma sequência de polipeptídeo possuir uma estrutura alfa-helix.

Como regra geral, são bastante apropriadas como adaptador todas aquelas sequências para as quais, com o programa de

computador "Microgenie" (Beckmann), na região da posição de processamento A-P-GEN, para uma sequência peptídica de pelo menos quatro aminoácidos, for calculada para ALPHA um valor positivo maior do que para as outras três possibilidades de estrutura (BETA, TURN, COIL).

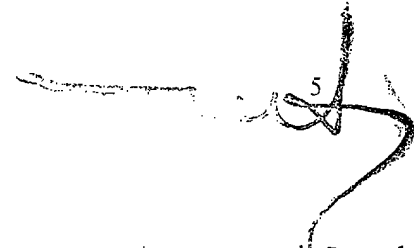
Para a utilização de acordo com a invenção o comprimento da sequência de adaptador A pode variar dentro de um grande intervalo. Está compreendido, regra geral, entre cinco e cem aminoácidos.

É de preferência utilizada como sequência de adaptador A a sequência com o comprimento de 38 aminoácidos SEQ ID NO:1 n.º 27-64.

Esta sequência pode ser usada como sequência de adaptador directamente ou, especialmente de preferência, depois do prolongamento no término C com um a quatro aminoácidos. São também muito apropriadas para o processo de acordo com a invenção partes desta sequência, de preferência as que são obtidas por encurtamento do término N.

Com base no programa de computador acima descrito, pode-se também, por exemplo, identificar a região da sequência que contribui em especial para a formação da alfa-helix, e optimizá-la ainda, no que se refere à estrutura alfa-helix, através da permuta de aminoácidos individuais.

O sinal de processamento P serve para a cisão do propeptídeo na forma madura. Habitualmente é utilizada como sinal de processamento uma sequência de aminoácidos básicos, de preferência de Lys ou Arg. É



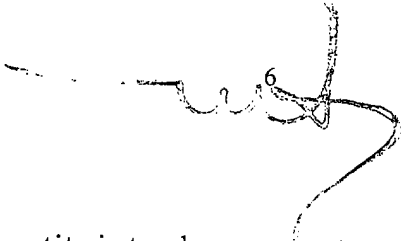
bastante apropriada como sinal de processamento a posição de reconhecimento KEX2 da *S. cerevisiae*, que consiste no dipeptídeo Lys - Arg e que também é reconhecida pela levedura *Hansenula*. Este dipeptídeo também pode ser utilizado em forma duplicada como sinal de processamento. É preferida como P a sequência Lys - Arg.

Como genes de estrutura GEN para a proteína em preparação podem ser utilizados genes heterólogos e homólogos. Os genes podem ser isolados dos correspondentes organismos ou podem ser preparados sinteticamente. Na síntese química dos genes pode também ser realizada, se desejado, uma adaptação da utilização de códon ao organismo de produção.

São de preferência utilizados como genes de estrutura genes eucarióticos e genes virais. O processo de acordo com a invenção decorre especialmente bem para a preparação de inibidores de trombina, por exemplo, de hirudina. Este processo também é bastante apropriado para a preparação de polipeptídeos humanos, por exemplo, de hormonas peptídicas, factores de crescimento, ou linfoquinas.

Os elementos de estrutura acima citados são dispostos na sequência L - A - P - GEN, de forma conhecida, numa "kassete" de expressão. O acoplamento é efectuado habitualmente por ligação de fragmentos de restrição compatíveis ou por síntese química.

As "kassetes" de expressão podem conter ainda uma série de sinais de regulação correntes, tais como promotores, pontos de ligação RBS, ou terminadores, que são ligados funcionalmente com os elementos de estrutura L - A - P - GEN de acordo com a invenção.



A "kassete" de expressão pode ser um constituinte de um vector replicável autonomamente ou também de um vector integrativo. A construção de um vector de expressão mediante a utilização da "kassete" de expressão é descrita no exemplo 1.

A levedura é transformada com o correspondente vector de expressão. Isto pode ser realizado, por exemplo, de acordo com o protocolo descrito no exemplo 2.

A partir das leveduras transformadas deste modo são isolados clones de expressão estável, que são apropriados como organismos de produção no processo de acordo com a invenção. Os organismos de produção são cultivados em condições correntes e, consoante os elementos de regulação escolhidos, produzem a proteína pretendida de uma forma constitutiva ou susceptível de indução. A proteína é segregada pelo organismo de produção para o meio envolvente, de onde pode ser facilmente isolada e purificada.

A purificação por isolamento do meio é realizada, como regra geral, depois de o organismo de produção ter sido separado, por meio de processos de purificação que são comuns na química das proteínas.

O processo de acordo com a invenção fornece proteínas maduras correctamente processadas, sem os defeitos de processamento que de outro modo seriam observados. Por consequência, este processo conduz a um elevado rendimento de proteínas maduras e facilita consideravelmente os passos seguintes da purificação. Por conseguinte, este processo é utilizável de forma particularmente boa na preparação de medicamentos à base de proteínas farmacêuticas.

Os exemplos que se seguem servem para uma melhor elucidação da presente invenção.

### Exemplo 1

Construção de vectores para a expressão secretórica de proteínas de recombinação a partir da espécie de levedura *Hansenula polymorpha*

Neste exemplo é descrita a construção de vectores de expressão que têm utilização na preparação, de acordo com a invenção, de proteínas de recombinação na levedura *Hansenula polymorpha*. A "kassete" de expressão utilizada no presente caso consiste, entre outros, nos seguintes componentes:

*leader*: aminoácidos 1-26 da SEQ ID NO: 1  
adaptador: aminoácidos 27-64 da SEQ ID NO: 1  
P: aminoácidos 65-66 da SEQ ID NO: 1  
GEN: gene de hirudina (SEQ ID NO: 2)

O produto construído era composto por dois fragmentos de ADN. O primeiro fragmento era constituído pelas sequências *leader*-adaptador-processamento referidas acima, assim como pelos nucleótidos do término 5' do gene de hirudina para os aminoácidos 1 (Val) até 7 (Thr) SEQ ID NO:2 (fragmento L-A-P-5'-Hir). O segundo fragmento era derivado dos restantes aminoácidos do gene de hirudina 8 (Glu) até 65 (Gln), SEQ ID NO:2) (fragmento 3'-Hir).

Para a preparação do fragmento L-A-P-5'-Hir foram sintetizados dois oligonucleótidos SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4. Os dois oligonucleótidos são complementares em sobreposição, nas suas extremidades 3' na região de 20 nucleótidos.

Por adição de trifosfatos de nucleósido e polimerases as moléculas de ADN nas secções de espiral simples, não complementares, foram completadas para uma espiral dupla, num PCR. O ADN foi multiplicado por adição de dois *primers* de amplificação (SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO:6) e amplificação PCR. O fragmento L-A-P-5'-Hir assim formado foi posteriormente seccionado na extremidade 5' com Eco R1 e na extremidade 3' com Hinf I.

O fragmento 3'-Hir foi preparado a partir de genes de hirudina conhecidos com o auxílio de dois *primers* de amplificação sintéticos (SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO:8) e amplificação PCR.

O fragmento assim obtido foi seccionado posteriormente com Hinf I na extremidade 5' e com Sal I na extremidade 3'.

O produto construído foi completado por ligação da posição Hinf I da extremidade 3' do fragmento L-A-P-5'-Hir com a posição Hinf I da extremidade 5' do fragmento 3'-Hir, assim como por ligação deste ADN, através de Eco RI/Sal I, no vector pUC 18.

A partir deste produto construído foi de novo isolado o fragmento L-A-P-HIR como fragmento EcoRI/Bgl II e foi ligado no correspondente vector de expressão de *H. polymorpha* pFMD 13025, previamente preparado (Gellissen G. et al., TIBTECH, 10, 413-417, 1992). Neste caso a extremidade 5' de L-A-P-HIR está fundida no promotor de *H. polymorpha* e a extremidade 3' do fragmento está fundida no terminador de *H. polymorpha*. A "kassete" de expressão está completada a partir deste momento e é um componente de um vector "vai-vém" [shuttle-vector] com o qual a levedura *H. polymorpha* pode ser

transformada, tanto com a finalidade da propagação em *E. coli* como também com a finalidade da expressão do gene estranho.

A mesma construção L-A-P foi fundida com o gene para o inibidor de trombina rhodniina, de *Rhodnius prolixus* (WO 93/8282), bem como com o gene para o inibidor de trombina moubatina, de *Ornithodoros moubata* (WO 93/9232). As "kassetes" de expressão obtidas nestas condições foram utilizadas analogamente aos produtos da fusão do gene de hirudina, para a construção de vectores de expressão de *Hansenula polymorpha*.

### Exemplo 2

Transformação de *Hansenula polymorpha* com os vectores de expressão

A estirpe hospedeiro para a transformação é um mutante auxotrófico obtido por mutagénesse EMS: uma estirpe com uma deficiência para orotidina-5'-fosfato-desidrogenase (*ura<sup>-</sup>*). A taxa de inversão deste mutante de uracilo pode ser desprezada.

As células competentes desta estirpe foram obtidas do seguinte modo (segundo Dohmen et al., *Yeast* 7, 691-692, 1992):

10 ml do meio pleno da levedura (YPD) foram inoculados com a estirpe hospedeiro e cultivados durante a noite a 37°C, mediante agitação. Esta pré-cultura foi sobre-inoculada em 200 ml de meio YPD e foi cultivada a 37°C, mediante agitação, até um valor  $OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 1,0$ . As células foram lavadas à temperatura ambiente com volumes de 0,5 ml da solução A (1M sorbitol, 10 mM de bicina pH 8,35, 3% de etilenoglicol) e em seguida foram de novo postas em suspensão em volumes de 0,02 ml da solução A.

Depois da adição de 11  $\mu$ l de DMSO as partes alíquotas foram conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até à transformação.

Para a transformação 10  $\mu$ g do ADN de plasmídeo e 100  $\mu$ l de solução de cloreto de cálcio 0,1 M fria foram adicionados directamente às células competentes frigorificadas.

Depois de uma rápida descongelação a  $37^{\circ}\text{C}$  cada preparado de transformação foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante uma hora com 1,0 ml da solução B (polietilenoglicol PEG a 40%, 200 mM de bicina pH 8,35). As células foram em seguida lavadas em 1 ml de solução C (150 mM de NaCl, 10 mM de bicina pH 8,35), foram postas de novo em suspensão em 200  $\mu$ l de solução C e foram aplicadas em placas em meio selectivo (YNB-glucose, complementação da deficiência de uracilo por plasmídeo de expressão  $\text{ura}^+$ ). A incubação foi realizada durante 3 a 5 dias a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Exemplo 3

#### Isolamento dos clones mitóticos estáveis

Os plasmídeos de expressão, de recombinação, que foram utilizados para a transformação de *H. polymorpha*, são susceptíveis de replicação autónoma e podem ser integrados espontaneamente no genoma da levedura. Nestas condições formam uma estrutura multímera: os monómeros do plasmídeo são ligados uns aos outros tipo "cabeça com a cauda".

Para a produção do produto genético de recombinação contribuem, por conseguinte, várias cópias da "kassete" de expressão. A produtividade de uma estirpe de recombinação, dentro de uma vasta margem, é linear relativamente ao número de "kassetes" de expressão

integradas. A integração multimerizada do ADN estranho no genoma da levedura e o isolamento de clones mitóticos estáveis foi alcançada do seguinte modo:

os transformandos, a partir das placas de agar, foram inoculados com meio selectivo em 3 ml do correspondente meio líquido, e "passados", isto é, durante um período de tempo de 1 a 2 semanas foram sempre transferidos e inoculados em meio YBN-glucose novo (50  $\mu$ l em 3 ml do meio, cultura a 37°C). Durante esta passagem o ADN do plasmídeo integrou-se no genoma da levedura, de modo que foram então obtidos clones mitóticos estáveis.

A estabilidade mitótica foi ensaiada da seguinte forma:

a partir da última cultura de "passagem" no meio YBN-glucose sobreincubou-se por três vezes, durante 1 a 2 dias, em meio pleno (YPD) e cultivou-se a 37°C. Em seguida a cultura diluída foi aplicada em placas em meio pleno e em meio selectivo. Os transformandos mitóticos estáveis produziram em ambos os meios aproximadamente o mesmo número de colónias. Podem ser isolados deste modo os subtransformandos mitóticos estáveis (Z. A. Janowicz et al., Yeast 7, 431-443, 1991).

#### Exemplo 4

##### Expressão de genes estranhos

Para os estudos de expressão os transformandos "passados" foram inoculados em 3 ml de meio YNB com 1% de glicerina ou 1% de metanol para induzirem promotores MOX ou FMD, respectivamente. As células, depois de dois dias de cultura a 37°C, foram separadas por

centrifugação e o sobrenadante da cultura foi ensaiado quanto a proteínas estranhas (Western-Blot, ELISA, teste de actividade).

Com transformandos mitóticos estáveis, segregados eficientemente, 50 ml de meio sintético foram inoculados com 1,5% de glicerina em balões de Erlenmeyer de 500 ml com chicana e foram incubados até um valor  $OD_{600 \text{ nm}} = 10$ . As análises por HPLC dos correspondentes sobrenadantes das culturas mostraram que as variantes de hirudina, no caso da utilização da sequência SEQ ID NO: 1, n.º 1 até 64 como *leader*-adaptador, é processada de forma absolutamente correcta.

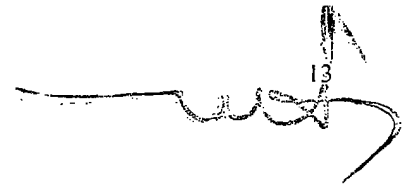
#### Exemplo 5

##### Fermentação de estirpes de levedura de recombinação

As estirpes de levedura de recombinação foram fermentadas em meio sintético (meio YNB duplamente concentrado 2,8 g/L (Difco) com 10 g/L de sulfato de amónio) que, ou tinha sido introduzido completamente no início da fermentação, ou foi sendo adicionado no decurso da fermentação.

Como fontes de carbono foram utilizados glicerina e metanol ou misturas de glicerina e metanol. A fermentação foi iniciada com glicerina como única fonte de carbono ( $\geq 1\%$  de glicerina de concentração final no fermentador durante a fase de crescimento).

Depois da esterilização do meio inoculou-se com 1 L da pré-cultura de modo que se produzisse um valor inicial  $OD_{600 \text{ nm}}$  de cerca de 1.



O curso da fermentação deu-se em duas fases: a uma fase de crescimento com uma concentração de glicerina mais elevada (1%) seguiu-se uma fase de produção com uma concentração de glicerina mais baixa (< 0,5%) ou com uma concentração de metanol constante (1%) ou com uma mistura de glicerina e metanol (0,1 a 0,4% de glicerina e 0,2 a 1,0% de metanol).

A fonte de carbono foi eventualmente realimentada por meio de diversas possibilidades de controle (continuamente ou acoplada a  $pO_2$ ).

No decurso da fermentação foram adicionados sulfato de amónio até uma concentração final de 5 g/L, tiamina até uma concentração final de 0,1 g/L e biotina até uma concentração final de 0,3 mg/L.

O valor do pH da fermentação foi mantido constante a 4,0 mediante a adição de amónia; a temperatura da fermentação foi de 37°C.

As estirpes de leveduras de recombinação assim fermentadas forneceram um produto genético (hirudina) processado correctamente a 100%.

14

PROTOCOLO DE SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: BASF Aktiengesellschaft

(B) RUA: Carl-Bosch-Strasse 38

(C) LOCALIDADE: Ludwigshafen

(E) PAÍS: República da Alemanha

(F) CÓDIGO POSTAL: D-67056

(G) TELEFONE: 0621/6048526

(H) TELEFAX: 0621/6043123

(I) TELEX: 1762175170

(A) NOME: Rhein Biotech GmbH

(B) RUA: Eichsfelder Strasse 11

(C) LOCALIDADE: Duesseldorf

(E) PAÍS: República da Alemanha

(F) CÓDIGO POSTAL: D-40595

(G) TELEFONE: 0211/709010

(H) TELEFAX: 0211/7090130

(ii) TÍTULO DO PEDIDO: Processo para a preparação de proteínas por recombinação em leveduras

(iii) NÚMERO DAS SEQUÊNCIAS: 8

(iv) FORMA A LER PELO COMPUTADOR:

(A) SUPORTE DE DADOS: "disquete"

(B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM

(C) SISTEMA DE TRABALHO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0; versão #1.25 (EPA)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
  - (A) COMPRIMENTO: 142 aminoácidos
  - (B) NATUREZA: aminoácidos
  - (D) TOPOLOGIA: linear
  
- (ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: peptídeo
  
- (iii) HIPOTÉTICA: NÃO
  
- (iii) SENTIDO INVERSO: NÃO
  
- (v) NATUREZA DO FRAGMENTO: *términus N*
  
- (vi) PROVENIÊNCIA ORIGINAL:
  - (A) ORGANISMO: *Carcinus maenas*
  
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
  - (A) NOME/CHAVE: peptídeo
  - (B) POSIÇÃO: 1...26
  - (D) OUTRAS INDICAÇÕES: /etiqueta = *leader*
  
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
  - (A) NOME/CHAVE: peptídeo
  - (B) POSIÇÃO: 27...66
  - (D) OUTRAS INDICAÇÕES: /etiqueta = adaptador
  
- (ix) CARACTERÍSTICAS:

16

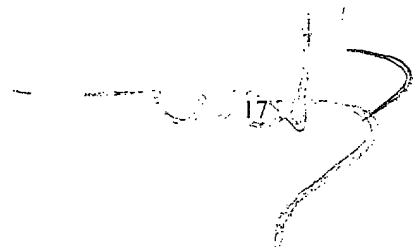
- (A) NOME/CHAVE: peptídeo
- (B) POSIÇÃO: 67...142
- (D) OUTRAS INDICAÇÕES: /etiqueta = CHH

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

Met Tyr Ser Lys Thr Ile Pro Ala Met Leu Ala Ile Ile Thr Val Ala  
1 5 10 15  
Tyr Leu Cys Ala Leu Pro His Ala His Ala Arg Ser Thr Gln Gly Tyr  
20 25 30  
Gly Arg Met Asp Arg Ile Leu Ala Ala Leu Lys Thr Ser Pro Met Glu  
35 40 45  
Pro Ser Ala Ala Leu Ala Val Glu Asn Gly Thr Thr His Pro Leu Glu  
50 55 60  
Lys Arg Gln Ile Tyr Asp Thr Ser Cys Lys Gly Val Tyr Asp Arg Ala  
65 70 75 80  
Leu Phe Asn Asp Leu Glu His Val Cys Asp Asp Cys Tyr Asn Leu Tyr  
85 90 95  
Arg Thr Ser Tyr Val Ala Ser Ala Cys Arg Ser Asn Cys Tyr Ser Asn  
100 105 110  
Leu Val Phe Arg Gln Cys Met Asp Asp Leu Leu Met Met Asp Glu Phe  
115 120 125  
Asp Gln Tyr Ala Arg Lys Val Gln Met Val Gly Arg Lys Lys  
130 135 140

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
  - (A) COMPRIMENTO: 65 aminoácidos
  - (B) NATUREZA: aminoácidos



(C) FORMA DE ESPIRAL: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iii) SENTIDO INVERSO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu Cys  
1                    5                    10                    15  
Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys Ile Leu Gly Ser  
                  20                    25                    30  
Lys Gly Glu Arg Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Arg Pro  
                  35                    40                    45  
Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln  
50                    55                    60                    65

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 140 pares de bases

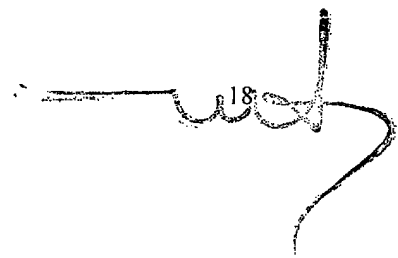
(B) NATUREZA: ácidos nucleicos

(C) FORMA DE ESPIRAL: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: ADN (genômico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:



GGGGGGGAAT TCATGTATAG CAAACTATT CCCGCCATGC 40  
TAGCAATCAT CACCGTAGCC TACCTATGCG CACTCCCGCA 80  
CGCACACGCA CGCTCCACGC AAGGCTACGG ACGCATGGAT 120  
CGCATCCTGG CGGCCTTGAA 140

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
  - (A) COMPRIMENTO: 122 pares de bases
  - (B) NATUREZA: ácidos nucleicos
  - (C) FORMA DE ESPIRAL: simples
  - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

GGGGGGGATT CAGTGCAGTC AGTGTAACA ACCCTCTTTT 40  
CCAACGGGTG TGTAGTTCCA TTCTCCACCG CTAGGGCTGC 80  
GCTGGGCTCC ATTGGCGAGG TTTTCAAGGC CGCCAGGATG 120  
CG 122

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
  - (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
  - (B) NATUREZA: ácidos nucleicos
  - (C) FORMA DE ESPIRAL: simples
  - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

GGGGGGGAAT TCATGTATAG C

21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases

(B) NATUREZA: ácidos nucleicos

(C) FORMA DE ESPIRAL: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

GGGGGGGATT CAGTGCAGTC A

21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases

(B) NATUREZA: ácidos nucleicos

(C) FORMA DE ESPIRAL: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

GGGGGGGAAT CCGGTCAGAA CCTGTGCCTG TGCGAA

36

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases

(B) NATUREZA: ácidos nucleicos

(C) FORMA DE ESPIRAL: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

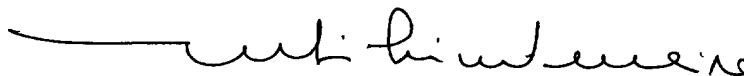
(ii) NATUREZA DA MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

GGGGGGGTCG ACCCTAGATC TCTATTACTG CAGGTATTCT TCCGG

45

Lisboa, - 8 AGO. 2000



Dra. Maria Silvana Ferreira  
Agente Oficial de Propriedade Industrial  
R. Castilho, 234-07 E - 1070-601 LISBOA  
Telefs. 213 851 805 - 213 854 613

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação, por recombinação, de proteínas em leveduras, caracterizado por a levedura ser transformada com uma "kassete" de expressão que contém codificados os seguintes elementos estruturais:

L - A - P - GEN

em que

- L: representa uma sequência *leader* de uma neurohormona peptídica animal,
- A: representa um adaptador que produz uma estrutura alfa-helix,
- P: representa um sinal de processamento e
- GEN: representa um gene de estrutura para a proteína pretendida.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por

- L: representar a sequência de aminoácidos 1 a 26 da SEQ ID NO:1,
- A: representar a sequência de aminoácidos 27 a 64 da SEQ ID NO:1, e
- P: representar a sequência de aminoácidos 65 a 66 da SEQ ID NO:1.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por ser utilizada como levedura uma levedura das espécies *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ou *Pichia*.

Lisboa, - 8 AGO. 2000

Dra. Maria Silvína Ferreira  
Agente Clássi de Propriedade Industrial  
R. Castilho, 201-04 E - 1070-051 LISBOA  
Telefs. 213 851 339 - 213 854 613