

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 97 397**


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

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE E DE GENES QUE A CODIFICAM".

**INVENTORES:** Wilhelmus Johannes Quax.

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

Países Baixos em 18 de Abril de 1990 e 20 de Dezembro de 1990, sob os N.ºs 90200962.0 e 90203463.6, respectivamente,



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, (inventor: Wilhelmus Johannes Quax, residente na Holanda), para PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE E DE GENES QUE A CODIFICAM".

## D E S C R I Ç Ã O

### ÂMBITO TÉCNICO

Esta invenção refere-se a um gene que codifica a penicilina G acilase, a penicilina G acilase codificada por este gene e a um processo para a preparação desta enzima.

### ANTECEDENTES E LITERATURA RELEVANTE

A penicilina G acilase (benzilpenicilina amido hidrolase, também designada por penicilina amidase; EC 3.5.1.11) é uma enzima utilizada comercialmente para hidrolisar a penicilina G ou a 3-desacetoxicefalosporina G para ácido fenilacético e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) ou ácido 7-aminodesacetoxicefalosporânico (7-ADCA), respectivamente, e os seus intermediários mais importantes para a produção industrial de penicilinas e cefalosporinas semisintéticas. Esta enzima também catalisa a reação inversa, isto é, a N-acilação de 6-APA e 7-ADCA com ésteres orgânicos para produzir os compostos correspondentes N-acetilados de penicilina e 3-cefem, respectivamente. Ver as revisões de Vandamme, E.J., em: Microbial Enzymes and Bioconversions, e E.H. Rose (Ed.), Economic Microbiology 5, 467-552 (1980); e P.B.Maha-

jan, Appl. Biochem. Biotechnol. 1, 83-86 (1982).

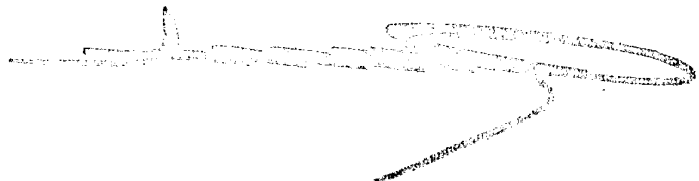
Têm sido propostos vários tipos de microorganismos na literatura como estirpes que produzem Penicilina G acilase úteis para a desacilação da penicilina G e 3-desacetoxicefalosporina G. Exemplos desses microorganismos produtores de acilase são certas estirpes das espécies Escherichia coli, Kluyvera citrophila e Proteus rettgeri deve ter-se em conta que alguma da actividade da penicilina F acilase foi descrita em fracções de células inteiras de Alcaligenes faecalis (C.A. Claveridge e col., Nature 4733, 237-238 (1960). Contudo, não foi descrita até agora uma enzima ou enzimas responsáveis por esta actividade de A. faecalis

A utilização dos processos de ADN recombinantes têm permitido um aumento dos níveis de produção das penicilinas G acilases comercialmente utilizadas (Mayer e col., Adv. Biotechnol. 1, 83-86 (1982) e alargou a compreensão do processamento destas enzimas (Schumacher e col., Nucleic Acids Res. 14, 5713-5727 (1986), Verificou-se que a penicilina G acilase de E. coli era produzida como uma grande proteína precursora, que foi ainda processada para a proteína madura periplásmica constituindo uma subunidade pequena ( $\alpha$ ) e uma grande ( $\beta$ ). A clonação e a sequenciação do gene da acilase de Kluyvera citrophila revelou uma harmonia coerente com o gene da acilase de E. coli (J.L. Barbero e col., Gene 49, 69-80 (1986)). Também para o gene da penicilina G acilase de Proteus rettgeri foi descrita uma subunidade pequena e uma grande (G.O. Daumy e col., Gene 49, 69-80 (1986); pedido de patente Espanhola No. 8602933).

#### RESUMO DA INVENÇÃO

Num dos aspectos da invenção é proporcionado um gene que codifica a penicilina G acilase que tem essencialmente a estrutura dada na Figura 1. O gene é preferivelmente obtido de A. faecalis.

Noutro aspecto da invenção é proporcionado um vector compreendendo o referido gene. Também é proporcionado um sistema hospedeiro que compreende uma ou mais cópias do referido gene.



A invenção proporciona ainda o referido gene de penicilina G acilase sob o controlo de um regulão compreendendo sequências de regulação de transcrição e/ou translacção em que as referidas sequências reguladoras são substituídas por outras sequências de regulação de transcrição e/ou translacção. Estas últimas sequências de regulação podem ser obtidas a partir do mesmo ou de outro organismo.

A presente invenção proporciona ainda um vector compreendendo este gene de penicilina G acilase, manipulado em relação às sequências de regulação tal como acima indicado, e um hospedeiro compreendendo o referido vector. A enzima de penicilina G acilase, resultante da expressão do referido gene tem uma estabilidade surpreendentemente boa e uma elevada actividade específica.

Em ainda outro aspecto da invenção é proporcionada a referida enzima de penicilina G acilase numa forma isolada. Quando utilizada em processos de acilação ou desacilação em grande escala ela é preferivelmente utilizada na forma imobilizada.

A presente invenção proporciona ainda um processo para a preparação da penicilina G acilase por fermentação de um hospedeiro transformado codificando a referida enzima, e a recuperação da penicilina G acilase na forma isolada.

Estas e outras realizações serão descritas e seguir com maior detalhe.

#### Breve descrição das figuras

Figura 1: mapa físico da região do gene de A. faecalis penicilina G acilase. É representada a inserção de pAF1.

Figura 2: Estrutura do plasmídeo pMcTNde

Figura 3: Estrutura do plasmídeo pMCTAF1A

Figura 4: Estrutura do promotor tac

Figura 5: Estrutura do promotor trp

Figura 6: Estrutura do plasmídeo pKTAF1A

Figura 7: Estrutura do promotor p78

Figura 8: Estrutura do promotor pf3

### Breve descrição das Listas de Sequências

Lista de sequências 1: Sequências de nucleótidos do gene de penicilina G acilase de A. faecalis e sequência derivada de aminoácidos da nova enzima pac.

Lista de sequências 2: Sequência de nucleótidos do promotor tac

Lista de sequências 3: Sequências de nucleótidos do promotor trp

Lista de sequências 4: Sequência de nucleótidos do promotor p78

Lista de sequências 5: Sequência de nucleótidos do promotor pf3

### Realizações específicas

A nova enzima penicilina G acilase de Alcaligenes faecalis (pac) pode ser isolada de forma conhecida: por exemplo, faz-se a cultura de uma estirpe de A. faecalis num meio de cultura adequado, consistindo por exemplo de extracto de fungo numa solução tamponada, em particular um tampão de fosfato a um valor de pH de cerca de 6 a 8, em particular cerca de 7, opcionalmente na presença do indutor KPA. Pode ser utilizada qualquer estirpe de A. faecalis. A enzima é em seguida purificada por um processo conhecido, de preferência em duas fases, a primeira com, por exemplo, uma celulose esterificada e posteriormente a aplicação de por exemplo, cromatografia de gel, aplicando em particular hidroxapatite.

A enzima purificada pode ser submetida a uma análise de sequência de aminoácidos dos fragmentos de péptidos, preferivelmente no terminal NH<sub>2</sub>-de cada uma das subunidades. A partir da sequência de aminoácidos determinada pode ser derivada uma sonda de ADN para detectar a sequência de genes. Foi estabelecido pela primeira vez que a actividade hidrolisante da penicilina de A. faecalis reside na penicilina acilase purificada, que parece ser um heterodímero com duas subunidades de 26 kD e 59 kD de tamanho.

O gene de A. faecalis pac pode ser identificado a partir do ADN cromossômico de forma conhecida. O gene possui essencialmente uma estrutura como a que se mostra na Figura 1.  
• Deve entender-se que todos os genes homólogos que podem hibridi-

zar com a sequência referida na Figura 1 e que codificam uma enzima com essencialmente a mesma estrutura estão englobados nesta invenção. A seguinte equação, que foi derivada da análise da influência de diferentes factores na estabilidade do híbrido:  $T_m = 81 + 16,6 (10g \ 10 \ C_i) + 0,4 (\% \ G + C) - 600/n - 1,5\%$  de incoerência (Ausubel et col., supra) em que

$n$  = comprimento da cadeia mais pequena da sonda

$C_i$  = força iónica (M)


$G + C$  = composição de base,

pode ser utilizada para determinar o nível de homologia que pode ser detectado utilizando as técnicas de hibridação de ADN-ADN.

Assim o termo "essencialmente com a estrutura" pretende englobar sequências que podem incluir mutações conservativas, em que a sequência codifica o mesmo aminoácido, mas que podem diferir até 35% na sequência de ADN de acordo com a equação anterior, mais particularmente até 10%.

Uma comparação da homologia da sequência de aminoácidos da nova enzima A. faecalis pac com a sequência de aminoácidos publicada de E. coli penicilina G acilase (Schumacher e col., supra) revelou uma homologia global de apenas 43%. Além disso, a homologia da sequência de aminoácidos conhecida da enzima de Kluyvera citrophila pac (Barbero e col., supra) é também de apenas 44%.

O gene de A. faecalis pac pode ser expresso em E. coli com a ajuda do seu próprio promotor e/ou do promotor indutível tac ou trp (ver Figuras 4 e 5). Os resultados da produção de penicilina G acilase são surpreendentemente bons. Utilizando este gene pac com o promotor tac a produção é tão elevada como a que se obtém com a estirpe original de A. faecalis, enquanto que no último caso é necessário utilizar fenil acetato de potássio como indutor. A estirpe E. coli com o gene A. faecalis tac sob o controlo do promotor trp mostra, sem qualquer indução, uma produção de penicilina G acilase de até cinco vezes maior do que as estirpes acima mencionadas. Em ambas as estirpes a dependência da indução utilizando um indutor de fenil acetato de potássio, que é caro, pode agora ser evitada.



Para se obter uma estirpe de produção com apenas ADN homólogo, foi desenvolvida a transformação na própria A. faecalis. A transformação em ADN com sucesso em A. faecalis pode ser adequadamente conseguida por dois processos diferentes. Em primeiro lugar, pode ser obtida a transferência de conjugação de plasmídeos com uma larga gama de hospedeiros de E. coli para A. faecalis. Em segundo lugar, pode ser utilizada a electroporação de A. faecalis com plasmídeos baseados no replicão RSF 1010 (pul-sador de genes BIORAD).

Após clonação do gene de A. faecalis podem ser utilizadas diferentes sequências de transcrição. Em primeiro lugar, o gene pac de A. faecalis pode ser clonado em A. faecalis sob o controlo do seu próprio promotor. A produção de penicilina G acilase é muito melhorada quando comparada com a estirpe de A. faecalis sem genes pac extra e pouco dependente da indução por fenil acetato de potássio. Em segundo lugar, a utilização do promotor E. coli trp, independentemente de qualquer indutor, conduz a uma quantidade semelhantemente elevada de penicilina G acilase. Em terceiro lugar, por aplicação dos dois elementos de expressão derivados de Pseudomonas aeruginosa fago pf3, promotores pf3 e p78, (Luiten tese de PhD, Nijmegen (1986)), a produção de penicilina G acilase é um pouco inferior do que a que se consegue com a estirpe de A. faecalis com genes pac extra sob o controlo de si própria ou do promotor de E. coli trp, mas é ainda melhorada quando comparada com a estirpe de A. faecalis sem genes pac extra e é muito menos dependente da indução por fenil acetato de potássio.

A técnica anterior não ensina a utilização de A. faecalis para produzir penicilina G acilase na forma isolada. Também não foram referidos na técnica anterior até agora as propriedades superiores da nova enzima A. faecalis penicilina G acilase relacionadas com as de E. coli ou a utilização de processos de ADN recombinante para aumentar e facilitar a produção de penicilina G acilase a partir de A. faecalis.

A penicilina G acilase, produzida com o auxílio do gene A. faecalis pac, clonada em particular num microorganismo gram-negativo, de preferência num microorganismo Alcaligenes ou Escherichia, mais preferivelmente em A. faecalis, é pro-

duzida em quantidades surpreendentemente elevadas. Além disso, a estabilidade e especialmente a actividade específica do gene de penicilina G acilase é muito superior à das penicilinas acilases até agora conhecidas.

É também proporcionada uma preparação purificada de A. faecalis, que revela uma maior actividade específica desta enzima no substrato preferido de penicilina G de qualquer das penicilinas acilases até agora conhecidas. Além disso a preparação purificada é utilizada para determinar a termoestabilidade de A. faecalis penicilina G acilase em comparação com a E. coli penicilina acilase. A estabilidade de A. faecalis penicilina G acilase é significativamente superior à da E. coli penicilina G acilase, permitindo uma utilização prolongada em condições industriais.

Nos processos industriais, é utilizada de preferência na forma imobilizada a penicilina G acilase, e também a proporcionada pela presente invenção. O veículo em que ela é imobilizada compreende tipicamente gelatina opcionalmente reticulada com quitosano, óxido de alumínio, óxido de silício, resinas de permuta iónica ou pérolas de acrilato, como por exemplo Eupergit<sup>R</sup>.

Os seguintes exemplos ilustram melhor a presente invenção.

#### MATERIAIS E PROCESSOS

##### Clonagem e detecção dos genes de acilase

Foram seguidas as técnicas gerais de clonagem da forma descrita por Maniatis e col. (1982 e 1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory ou Ausubel e col. (1987, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc., New York) ou B. Perbal (1988, A Practical Guide to Molecular Cloning, 2a. edição, John Wiley and Sons Inc., Nova Iorque).

Estes livros de texto descrevem em detalhe os protocolos para a construção e propagação das moléculas de rADN, os procedimentos para preparar bibliotecas de genes e os protocolos para efectuar a mutação de ADN de forma dirigida a locais ou aleatórias. As enzimas utilizadas para as manipulações de ADN fo-



ram adquiridas e utilizadas de acordo com as instruções dos fornecedores comerciais. Os plasmídeos e hospedeiros de clonação de *E. coli* foram obtidos de colecções de culturas públicas como por exemplo a "Phabagen Collection" (Utreque).

### Meios

Os meios selectivos para a fenilacetil L-leucina (fal) foram preparados da forma já descrita (Garcia e col., *ibid*). As placas mínimas são as seguintes: M63 de ágar mínimo, 2 g/l de glicose, 1 mg/l de tiamina, 10 mg/l de L-prolina e o anti-biótico adequado (50 µg/ml de cloroanfenicol (cap) ou 25 µg/ml de ampicilina (amp.) Os transformantes de *E. coli* HB101 (Leu<sup>-</sup>) que cresciam exclusivamente na presença da acil L-leucina são considerados como contendo um gene de acilase.

Meio E\* mínimo:

16 g/l de ágar Difco, elementos de esporos  
0.2 g/l de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.5 g/l de Na  
(NH<sub>4</sub>)HPO<sub>4</sub>,  
1.6 g/l de citrato de sódio.

meio 4xLBC:

Extracto de levedura 20 g/l, bactotripton 40 g/l, NaCl  
10 g/l, casaminoácidos 4 g/l, basildon 0.25 g/l (antiespu-  
mante 86-013, Basildon Chemical Corporation), pH 7.0.

Meio (Alcaligenes faecalis):

Extracto de levedura 15 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 4.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
3.4 g/l, pH 7.0 (no caso de indução: potássio ácido fenil-  
acético (KPA) 1.0 g/l)

Meio 2xTY:

16 g/l de bactotripton, 10 g/l de extracto de  
levedura, 5 g/l de NaCl.

A fenilacetilleucina foi adquirida de IGSS,  
Transferbureau Nijmegen.

A A. faecalis estirpe ATCC 19018 (também deposi-  
tada como NCTC 415) foi utilizada como estirpe dadora para o gene  
de A. faecalis pac, e como hospedeiro para plasmídeos recombinan-

tes.

As estirpes Jm101, WK6 e HB101 de *E. coli* (Phagen, Utreque) foram utilizadas como hospedeiros para os plasmídeos recombinantes.

#### Exemplo 1

Purificação e caracterização de *A. faecalis* penicilina acilase

A *A. faecalis*, estirpe ATCC 19018, foi cultivada num meio AF. As células foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas no seguinte tampão: Tris 0,1 M pH 8,0; EDTA 0,2 mM; lisozima 0,02 mg/ml e incubadas durante 2 horas a 30°C. Foram removidos os resíduos celulares por centrifugação.

A penicilina G acilase (pac) foi purificada em duas fases. A primeira fase foi efectuada com carboximetil celulose (CM-52 Whatman). A segunda consistia na eliminação das proteínas de contaminação restantes através de cromatografia de gel de hidroxapatite (Biogel HTP de Biorad). A pac pura resultante mostrou ser constituída por duas subunidades não idênticas. A subunidade pequena ( $\alpha$ ) e a grande ( $\beta$ ) foram submetidas a uma análise de aminoácidos de terminal NH<sub>2</sub>. O resultado obtido foi o seguinte:

subunidade	(26 KDa)	NH <sub>2</sub> -Q-X-Q-X-V-E-V-M-X-T
subunidade	(59 KDa)	NH <sub>2</sub> -S-N-L-W-S-T-X-P-E-X-V-

#### Exemplo 2

Clonação do gene de *A. faecalis* penicilina acilase

Foi isolado o ADN cromossômico de *A. faecalis* (ATCC 19018) e parcialmente digerido com Sau3A. As fracções que variavam de 4 kb até 7 kb foram purificadas ligadas ao vector pACY184, que foi digerido com BamHI. O ADN foi transformado em *E. coli* HB101 e colocado em placas de fal (ver os processos). Podiam ser identificados dois clones positivos pAF1 e pAF2. Estes clones foram também ensaiados com resultados positivos na técnica de sobreposição de *Serratia marcescens* (Meevootison, V.

e col., Appl. Microbiol. Biotechnol, 25, 372-378 (1987). A inserção de 6,4 kb do plasmídeo pAF1 é apresentada na Figura 1. A localização do gene foi determinada com o auxílio de um oligonucleótido concebido na sequência do terminal NH<sub>2</sub> da subunidade-β de A. faecalis pac.

Foi utilizado o seguinte oligonucleótido como sonda de hibridização na inserção de pAF1:

AGC AAC CTG TGG AGC A/C C/G C TGC CCG GAG TGC GT

A partir da posição do sinal de hibridização no mapa de restrição foi determinada a orientação do gene de A. faecalis pac (Figura 1).

### Exemplo 3

Determinação da sequência de A. faecalis penicilina acilase

O subclone de 3,9 kb de Sau3A-NdeI da inserção de 6,4 kb, revelou ter a actividade pac, enquanto que o fragmento de 3,1 kb de Sau3A-SphI era inactivo (Figura 1). A sequência de ADN da inserção de 3,9 kb foi determinada por sequenciação de desoxi dos fragmentos adequados em pTZ18R a pTZ19R (Pharmacia). A sequência de ADN codificante e a sequência de aminoácidos derivada para A. faecalis pac é mostrada na Lista de sequências 1. A partir da sequência de aminoácidos derivada pode concluir-se que o A. faecalis pac é codificado como uma cadeia única e grande de polipéptidos que sofre o processamento em duas subunidades diferentes designadas por α e β. No ponto 5' do precursor apresenta-se uma sequência de sinal típica responsável pela translocação da enzima para o periplasma.

### Exemplo 4

Expressão de penicilina acilase em E. coli

Foi digerido o plasmídeo pAF1 com SalI e foi purificado um fragmento de 4,8 kb. O fragmento foi ligado a um vector pMCT-Nde linearizado com SalI. Este último vector foi construído a partir do plasmídeo pMc5-8 (EP-A-0351029) por inserção de um fragmento contendo o promotor tac seguido de um local RBS e um local de clonação NdeI (Figura 2). O plasmídeo resultante

pMcTAF1A (Figura 3) obtido após transformação em E. coli HB101 exprime pac sob o controlo do seu próprio promotor e/ou do promotor tac que pode ser induzido (De Boer e col., Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 21 (1983)).

Para melhorar ainda mais o nível de expressão de pac foram clonados dois fortes promotores de E. coli numa fusão precisa do codão de partida de acilase. Para efectuar isto, construiu-se um local NdeI no codão de partida ATG utilizando a técnica de mutagénese dirigida a locais de oligonucleótidos (Stan ssens e col., 1989) do plasmídeo pMcTAF1A resultando o plasmídeo pMcTAF1ANde. Este plasmídeo foi digerido com NdeI e recircularizado resultando no posicionamento correcto do promotor tac em frente do gene de acilase (plasmídeo pMcAftac). Para inserir outro plasmídeo promotor foi digerido pMcTAF1Nde com EcoRI e NdeI e o maior fragmento foi purificado com gel de agarose. Os fragmentos do promotor de triptofano foram inseridos neste fragmento de EcoRI-NdeI de pMcTAF1ANde utilizando 6 oligonucleótidos sintéticos.

As sequências de ADN destes promotores são representadas nas Listas de Sequências 2 e 3, respectivamente, e as estruturas destes promotores são representadas nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Estas construções de promotores foram transformadas em E. coli HB101 e ensaiadas para a expressão em pac. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos quando comparados com o nível de expressão de A. faecalis ATCC 19018. A indução do promotor tac com isopropiltio- $\beta$ -galactósido (IPTG) e do promotor trp com ácido indol acrílico (IAA) foi também ensaiada.

Tabela 1: Expressão de pac em E. coli

Estirpe	KPA	IAA	IPTG	PAC	Unidades*
<u>A. faecalis</u> ATCC 19018	-	-	-		0.1
<u>A. faecalis</u> ATCC 19018	+	-	-		1
pMcAftac	-	-	-		1
pMcAftac	-	-	+		17
pMcAFtrp	-	-	-		4
pMcAFtrp	-	+	-		5

\* unidades relativas fom A. faecalis ATCC 19018 no meio com KPA normalizado a 1,0.

A E. coli HB101 contendo vários plasmídios foi cultivada em meio 4XLBC durante 24 horas. Foi cultivada a A. faecalis em meio AF durante 24 horas.

#### Exemplo 5

##### Expressão de penicilina acilase em A. faecalis

Para permitir a transferência estável da informação genética para A. faecalis tiveram de ser procurados um sistema de transformação de ADN e um vector de clonação estável. Verificou-se com surpresa que a coerência triparental do plasmídio pK248 (Bagdasarian e col., Gene 16, 237-247 (1981)) em A. faecalis era possível por aplicação de uma técnica já descrita (Friedman e col., Gene 18, 289-296 (1982) cop as seguintes modificações

- E. coli MC1061 contendo plasmídio auxiliar pRK2013 (Figurski & Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1648 (1979)) é misturado com E. coli HB101 (pKT248) e a estirpe recipiente de A. faecalis em placas de ágar 2xTY.

- As placas são incubadas a 30°C durante a noite para permitir a conjugação.

- As placas de conjugação são replicadas para placas de ágar selectivas contendo um meio E\* mínimo incluindo citrato, elementos de esporos e a fase de antibióticos selectivos (50 µg/ml) e de cap (25 µg/ml). É feita a incubação a 30°C durante a noite. Devido aos marcadores auxotróficos as estirpes de E. coli são escolhidas contra eles para este efeito. As colónias de A. faecalis são posteriormente dispersas em placas de 2xTY contendo 300 µl/ml de estreptomicina.

A subclonação do gene de A. faecalis pac foi feita no local único SalI do plasmídio pKT248. O fragmento ThIII-HpaI do plasmídio pAF1 foi isolado e introduzido com polimerase de Klenov. O local SalI de pKT248 linearizado foi também tornado Elgo na extremidade e o plasmídio pKTAF1 (Figura 6) foi obtido após transformação em E. coli HB101 e selecção em placas de fal. Após isolamento este plasmídio foi transferido para a A. faecalis

utilizando a técnica de coerência triparental da forma acima descrita. A estirpe obtida foi cultivada em frascos agitados com meio de cultura de *A. faecalis* e comparados com a estirpe original. Como se pode observar na Tabela 2 a produção de pac na estirpe com pKTAFa é muito aumentada. Além disso pode observar-se que mesmo na ausência do indutor KPA pode ser obtida uma elevada produção. Isto permite a omissão do indutor KFA que é caro, a partir de meios industriais de fermentação.

Para ensaiar os promotores heterólogos em frente do gene tac o fragmento de EcoRI-SalI de pMCAFtrp, pMCAFpf3 e pMCAFp78, respectivamente, foram subclonados em EcoRI, SalI vector linearizado pJRD215 (Davison e col., Gene 51, 275-280 (1987)) Todas as três construções de promotores foram obtidas em *E. coli* HB101 como pJRDAFtrp, pJRDAFpf3 e pJRDAFp78 e posteriormente transferidas para *A. faecalis* ATCC 19018. A expressão de pac destes plasmídios foi ensaiada na presença ou ausência de KPA (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de pac em transformantes de *A. faecalis*

Estirpe	KPA	IAA	PAC Unidades*
pKT248	-	-	0.1
pKT248	+	-	1
pKTAFa	-	-	18
pKTAFa	+	-	22
pJRDAFtrp	-	-	18
pJRDAFtrp	-	+	19
pJRDAFpf3	-	-	5
pJRDAFpf3	+	-	8
pJRDAFp78	-	-	3
pJRDAFp78	+	-	5

\* unidades relativas com *A. faecalis* ATCC 19018 no meio com KPA normalizado a 1,0.

Todos os plasmídios foram transferidos por coerência triparental para *A. faecalis* ATCC 19018. Os promotores p78 e pf3 são seleccionados do fago pf3 (Luiten, supra). As sequências de ADN destes promotores são apresentadas nas Listas de

Sequências 4 e 5, respectivamente, e a estrutura destes promotores nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

#### Exemplo 6

Estabilidade de A. faecalis penicilina acilase

A A. faecalis penacilase e E. coli foram ensaiadas para determinar a termoestabilidade utilizando o seguinte protocolo: soluções de enzima são incubadas a várias temperaturas durante 5 minutos numa solução de fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5. A actividade residual foi medida a 35°C com 50 mM penicilina G como substrato. As temperaturas com 100%, 50% e 0% actividade residual após 5 minutos foram também determinadas. A partir da Tabela 2 pode concluir-se que a enzima de A. faecalis é significativamente mais estável do que a enzima de E. coli.

	100%	50%	0%
<u>A. faecalis</u>	45°C	58.0°C	66°C
<u>E. coli</u> 5K	40°C	54.8°C	60°C

A preparação de enzima de E. coli 5K foi obtida a partir de Produktions Gesellschaft fur Biotechnologie Braunschweig (Mayer et al., supra).

## REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de penicilina G acilase caracterizado por se efectuar a cultura de um hospedeiro transformado que compreende um vector que contém um ou mais genes que codificam a penicilina G acilase e que possuem essencialmente a sequência de nucleótidos representada na Lista de Sequência 1

TIPO DE SEQUÊNCIA: nucleótido com a proteína correspondente

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 2451 pares base

NUMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLECULA: genómica

ORGANISMO: *Alcaligenes faecalis*

CARACTERÍSTICAS: de péptido com 1 a 2451 pb

PROPRIEDADES: gene codificando a penicilina acilase

ATG CAG AAA GGG CTT GTT CGT ACC GGG CTT GTG GCC GCT GGT TTG ATC 48  
Met Gln Lys Gly Leu Val Arg Thr Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu Ile  
1 5 10 15



~~CONFIDENTIAL~~

TTG GGT TGG GCG GGG GCA CCG ACC CAC GCG CAA GTG CAG TCG GTA GAG Leu Gly Trp Ala Gly Ala Pro Thr His Ala Gln Val Gln Ser Val Glu 20 25 30	96
GTG ATG CCG GAC AGT TAT GGC GTG CCG CAC GTC TTT GCC GAC AGC CAC Val Met Arg Asp Ser Tyr Gly Val Pro His Val Phe Ala Asp Ser His 35 40 45	144
TAT GGC TTG TAT TAC GGC TAT GGT TAT GCG GTC GCC CAA GAC CGT CTG Tyr Gly Leu Tyr Tyr Gly Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Gln Asp Arg Leu 50 55 60	192
TTC CAG ATG GAC ATG GCG CGT CGC TCC TTT GTC GGC ACA ACC GCC GCC Phe Gln Met Asp Met Ala Arg Arg Ser Phe Val Gly Thr Thr Ala Ala 65 70 75 80	240
GTC TTA GGC CCT GGT GAG CAA GAT GCC TAC GTC AAG TAC GAC ATG CAG Val Leu Gly Pro Gly Glu Gln Asp Ala Tyr Val Lys Tyr Asp Met Gln 85 90 95	288
GTG CCG CAG AAC TTC ACC CCG GCT TCC ATA CAG CCG CAG ATC GCG GCC Val Arg Gln Asn Phe Thr Pro Ala Ser Ile Gln Arg Gln Ile Ala Ala 100 105 110	336
TTG TCC AAG GAT GAG CGC GAT ATT TTT CGT GGC TAT GCC GAT GGC TAT Leu Ser Lys Asp Glu Arg Asp Ile Phe Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr 115 120 125	384
AAC GCC TAT CTG GAG CAG GTG CCG CGT CGC CCT GAG TTG CTG CCC AAA Asn Ala Tyr Leu Glu Gln Val Arg Arg Arg Pro Glu Leu Leu Pro Lys 130 135 140	432
GAA TAT GTG GAT TTT GAT TTC CAG CCC GAG CCG CTG ACC GAC TTT GAT Glu Tyr Val Asp Phe Asp Phe Gln Pro Glu Pro Leu Thr Asp Phe Asp 145 150 155 160	480
GTG GTC ATG ATC TGG GTG GGC TCC ATG GCC AAT CGC TTC TCC GAC ACG Val Val Met Ile Trp Val Gly Ser Met Ala Asn Arg Phe Ser Asp Thr 165 170 175	528
AAT CTG GAA GTG ACG GCA CTG GCC ATG CGT CAG TCT CTG GAG AAA CAG Asn Leu Glu Val Thr Ala Leu Ala Met Arg Gln Ser Leu Glu Lys Gln 180 185 190	576
CAC GGC CCG GAA CGA GGC CGT GCC TTG TTT GAT GAG CTG CTG TGG ATC His Gly Pro Glu Arg Gly Arg Ala Leu Phe Asp Glu Leu Leu Trp Ile 195 200 205	624
AAT GAC ACA ACA GCT CCC ACT ACG GTT CCG GCC CCC GCT GCC GAG CAC Asn Asp Thr Thr Ala Pro Thr Thr Val Pro Ala Pro Ala Ala Glu His 210 215 220	672
AAG CCG CAG GCA CAA GCA GGG ACG CAG GAT CTG GCT CAT GTT TCC TCG Lys Pro Gln Ala Gln Ala Gly Thr Gln Asp Leu Ala His Val Ser Ser 225 230 235 240	720
CCA GTA CTG GCT ACC GAG CTA GAG CGC CAG GAC AAG CAC TGG GGC GGC Pro Val Leu Ala Thr Glu Leu Glu Arg Gln Asp Lys His Trp Gly Gly 245 250 255	768

CGT GGC CCG GAC TTC GCG CCC AAG GCT AGC AAC CTG TGG AGC ACT CGC Arg Gly Pro Asp Phe Ala Pro Lys Ala Ser Asn Leu Trp Ser Thr Arg 260 265 270	816
CCC GAG CGA GTG CAG GAG GGC TCG ACC GTA CTG ATC AAC GGC CCA CAG Pro Glu Arg Val Gln Glu Gly Ser Thr Val Leu Ile Asn Gly Pro Gln 275 280 285	864
TTT GGC TGG TAC AAC CCG GCC TAC ACC TAT GGC ATT GGC TTG CAT GGC Phe Gly Trp Tyr Asn Pro Ala Tyr Thr Tyr Gly Ile Gly Leu His Gly 290 295 300	912
GCC GGC TTC GAT GTG GTG GGT AAT ACG CCT TTT GCC TAT CCG ATC GTA Ala Gly Phe Asp Val Val Gly Asn Thr Pro Phe Ala Tyr Pro Ile Val 305 310 315 320	960
CTG TTT GGC ACC AAT AGC GAG ATT GCC TGG GGG GCG ACT GCT GGC CCG Leu Phe Gly Thr Asn Ser Glu Ile Ala Trp Gly Ala Thr Ala Gly Pro 325 330 335	1008
CAA GAT GTG GTG GAC ATA TAT CAG GAA AAA TTG AAC CCC TCG CGT GCC Gln Asp Val Val Asp Ile Tyr Gln Glu Lys Leu Asn Pro Ser Arg Ala 340 345 350	1056
GAT CAG TAC TGG TTC AAC AAT GCC TGG CGC ACG ATG GAG CAG CGC AAG Asp Gln Tyr Trp Phe Asn Asn Ala Trp Arg Thr Met Glu Gln Arg Lys 355 360 365	1104
GAA CGT ATC CAG GTA CGC GGT CAG GCT GAT CCG GAA ATG ACG ATC TGG Glu Arg Ile Gln Val Arg Gly Gln Ala Asp Arg Glu Met Thr Ile Trp 370 375 380	1152
CGC ACC GTG CAC GGC CCT GTG ATG CAG TTT GAT TAC GAT CAG GGC GCG Arg Thr Val His Gly Pro Val Met Gln Phe Asp Tyr Asp Gln Gly Ala 385 390 395 400	1200
GCG TAC AGC AAG AAA CGC AGC TGG GAT GGC TAT CAG GTG CAG TCC TTG Ala Tyr Ser Lys Lys Arg Ser Trp Asp Gly Tyr Glu Val Gln Ser Leu 405 410 415	1248
CTA GCC TGG TTG AAC GTG GCC AAG GCC CGC AAC TGG ACG GAG TTT CTG Leu Ala Trp Leu Asn Val Ala Lys Ala Arg Asn Trp Thr Glu Phe Leu 420 425 430	1296
GAT CAA GCC AGC AAG ATG GCG ATT TCG ATC AAC TGG TAC TAC GCC GAC Asp Gln Ala Ser Lys Met Ala Ile Ser Ile Asn Trp Tyr Tyr Ala Asp 435 440 445	1344
AAG CAC GGC AAT ATT GGT TAT GTC TCG CCG GCC TTC CTG CCC CAG CGT Lys His Gly Asn Ile Gly Tyr Val Ser Pro Ala Phe Leu Pro Gln Arg 450 455 460	1392
CCT GCC GAT CAG GAC ATC CGT GTC CCT GCC AAG GGG GAT GGC AGC ATG Pro Ala Asp Gln Asp Ile Arg Val Pro Ala Lys Gly Asp Gly Ser Met 465 470 475 480	1440
GAG TGG CTG GGC ATC AAG AGT TTC GAC GCG ATT CCC AAA GCC TAC AAT Glu Trp Leu Gly Ile Lys Ser Phe Asp Ala Ile Pro Lys Ala Tyr Asn 485 490 495	1488

CCA CCC CAG GGC TAT CTG GTC AAC TGG AAC AAC AAG CCT GCG CCG GAC Pro Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Trp Asn Asn Lys Pro Ala Pro Asp 500 505 510	1536
AAA ACC AAT ACG GAT ACT TAC TAT TGG ACC TAT GGC GAC CGC ATG AAT Lys Thr Asn Thr Asp Thr Tyr Tyr Trp Thr Tyr Gly Asp Arg Met Asn 515 520 525	1584
GAA CTG GTC AGT CAG TAC CAG CAG AAA GAC CTC TTC AGT GTG CAG GAG Glu Leu Val Ser Gln Tyr Gln Gln Lys Asp Leu Phe Ser Val Gln Glu 530 535 540	1632
ATC TGG GAG TTC AAT CAA AAA GCC TCC TAT AGC GAT GTG AAC TGG CGC Ile Trp Glu Phe Asn Gln Lys Ala Ser Tyr Ser Asp Val Asn Trp Arg 545 550 555 560	1680
TAC TTC CGC CCA CAT CTG GAA AAG CTG GCG CAA CAG CTG CCG GCC GAC Tyr Phe Arg Pro His Leu Glu Lys Leu Ala Gln Gln Leu Pro Ala Asp 565 570 575	1728
GAT AGC AGC AAG GCG GCG CTG ACG ATG TTG CTC GCC TGG GAT GGA ATG Asp Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Met Leu Leu Ala Trp Asp Gly Met 580 585 590	1776
GAA CAG GAT CAG GGA GGG CAA AAT GCC GGA CCG GCG CCG GTG CTC TTC Glu Gln Asp Gln Gly Gly Gln Asn Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu Phe 595 600 605	1824
AAG ACC TGG CTG GAA GAA ATG TAC AAG CAG GTC TTG ATG CCG GTG GTG Lys Thr Trp Leu Glu Glu Met Tyr Lys Gln Val Leu Met Pro Val Val 610 615 620	1872
CCT GAA TCG CAT CGC GCC ATG TAT AGC CAG ACT GGT TTT GCC ACG CAG Pro Glu Ser His Arg Ala Met Tyr Ser Gln Thr Gly Phe Ala Thr Gln 625 630 635 640	1920
CAA GGT CCC AAC CCC GGT TCC ATC AAC TTG AGC ATG GGC ACC AAG GTC Gln Gly Pro Asn Pro Gly Ser Ile Asn Leu Ser Met Gly Thr Lys Val 645 650 655	1968
TTG TTG CGT GCC TTG GTG CTG GAA GCC CAT CCC GAT CCC AAG CGT GTG Leu Leu Arg Ala Leu Val Leu Glu Ala His Pro Asp Pro Lys Arg Val 660 665 670	2016
AAT GTC TTT GGT GAG CGT TCG TCT CAG GAA ATC ATG CAC ACA GCT TTG Asn Val Phe Gly Glu Arg Ser Ser Gln Glu Ile Met His Thr Ala Leu 675 680 685	2064
CAA AAT GCG CAG GCC CGC TTG AGC CAG GAG CAG GGC GCT CAG ATG GCG Gln Asn Ala Gln Ala Arg Leu Ser Gln Glu Gln Gly Ala Gln Met Ala 690 695 700	2112
CGC TGG ACC ATG CCG ACC TCC GTG CAT CGT TTC AGC GAC AAG AAC TTC Arg Trp Thr Met Pro Thr Ser Val His Arg Phe Ser Asp Lys Asn Phe 705 710 715 720	2160
ACG GGA ACC CCG CAG ACG ATG CCT GGC AAT ACC TTT GCC TTT ACC GGC Thr Gly Thr Pro Gln Thr Met Pro Gly Asn Thr Phe Ala Phe Thr Gly 725 730 735	2208

~~CONFIDENTIAL~~

TAT CAG AAT CGA GGC ACG GAA AAT AAC CGC GTG GTG TTT GAT GCC AAG Tyr Gln Asn Arg Gly Thr Glu Asn Asn Arg Val Val Phe Asp Ala Lys 740 745 750	2256
GGC GTG GAG TTC TGC GAC GCC ATG CCG CCC GGC CAA AGC GGT TTC ACC Gly Val Glu Phe Cys Asp Ala Met Pro Pro Gly Gln Ser Gly Phe Thr 755 760 765	2304
GAC CGC AAT GGA GTG CGC AGC CCG CAT TAT GAG GAT CAG CTG AAG TTG Asp Arg Asn Gly Val Arg Ser Pro His Tyr Glu Asp Gln Leu Lys Leu 770 775 780	2352
TAC GAG AAC TTC GAG TGC AAG ACG ATG GAT GTG ACG CAT GCG GAC ATT Tyr Glu Asn Phe Glu Cys Lys Thr Met Asp Val Thr His Ala Asp Ile 785 790 795 800	2400
CGT CGT AAT GCG CAA AGC AGC ACG ATG CTG TTG ATT CAG CCT CAG CCT Arg Arg Asn Ala Gln Ser Ser Thr Met Leu Leu Ile Gln Pro Gln Pro 805 810 815	2448
TAA End	2451

e recuperar-se em seguida a forma isolada de penicilina G acilase.

- 2<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o vector utilizado conter um gene que é isolado

de Alcaligenes faecalis.

- 3<sup>a</sup> -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por o vector utilizado conter o gene sob o controlo de um regulão que compreende as sequências de transcrição e/ou translacção, em que um ou mais das referidas sequências de regulação foram substituídas por outras sequências de transcrição e/ou translacção obtidas, respectivamente, do mesmo ou de outro organismo.

- 4<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por as sequências de transcrição do gene de penicilina G acilase serem substituídos pelo promotor trp.

- 5<sup>a</sup> -

Processo de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por o hospedeiro transformado ser um microorganismo gram-negativo.

- 6<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o microorganismo pertencer ao género Alcaligenes ou Escherichia.

- 7<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o hospedeiro transformado ser Alcaligenes faecalis.

- 8a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 a 3, caracterizado por se obter uma penicilina G acilase sob a forma imobilizada.

- 9<sup>a</sup> -

Processo para a preparação, ou aumento da produção, de penicilina G acilase num hospedeiro, caracterizado por:

- (i) preparar-se um vector ADN tal como definido nas reivindicações 1 a 4, (ii) transformar-se o hospedeiro com o referido vec-

- 20 -

tor, e (iii) clonarem-se os transformantes resultantes e escolherem-se os mesmos.

- 10<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por se transformar um microorganismo gram-negativo.

- 11<sup>a</sup> -

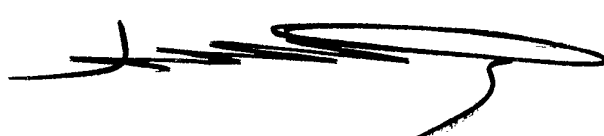
Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por se transformar um microorganismo do género Alcaligenes ou Escherichia.

- 12<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por se transformar o microorganismo Alcaligenes faecalis.

A requerente reivindica as prioridades dos pedidos de patente europeia apresentados em 18 de Abril de 1990 e em 20 de Dezembro de 1990, sob os N.ºs. 90200962.0 e 90203463.6, respectivamente.

Lisboa, 18 de Abril de 1991



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE E DE GENES  
QUE A CODIFICAM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de penicilina G acilase que compreende efectuar-se a cultura de um hospedeiro transformado constituído por um vector que contém um ou mais genes que codificam a penicilina G acilase e que possuem essencialmente a sequência de nucleótidos representada na Lista de Sequência 1

TIPO DE SEQUÊNCIA: nucleótido com a proteína correspondente

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 2451 pares base

NUMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLECULA: genómica

ORGANISMO: *Alcaligenes faecalis*

CARACTERÍSTICAS: de péptido com 1 a 2451 pb

PROPRIEDADES: gene codificando a penicilina acilase

ATG CAG AAA GGG CTT GTT CGT ACC GGG CTT GTG GCC GCT GGT TTG ATC 48  
Met Gln Lys Gly Leu Val Arg Thr Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu Ile  
1 5 10 15


TTG GGT TGG GCG GGG GCA CCG ACC CAC GCG CAA GTG CAG TCG GTA GAG 96  
Leu Gly Trp Ala Gly Ala Pro Thr His Ala Gln Val Gln Ser Val Glu  
20 25 30

GTG ATG CCG GAC AGT TAT GGC GTG CCG CAC GTC TTT GCC GAC AGC CAC 144  
Val Met Arg Asp Ser Tyr Gly Val Pro His Val Phe Ala Asp Ser His  
35 40 45

TAT GGC TTG TAT TAC GGC TAT GGT TAT GCG GTC GCC CAA GAC CGT CTG 192  
Tyr Gly Leu Tyr Tyr Gly Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Gln Asp Arg Leu  
50 55 60

TTC CAG ATG GAC ATG GCG CGT CGC TCC TTT GTC GGC ACA ACC GCC GCC 240  
Phe Gln Met Asp Met Ala Arg Arg Ser Phe Val Gly Thr Thr Ala Ala  
65 70 75 80

GTC TTA GGC CCT GGT GAG CAA GAT GCC TAC GTC AAG TAC GAC ATG CAG 288  
Val Leu Gly Pro Gly Glu Gln Asp Ala Tyr Val Lys Tyr Asp Met Gln  
85 90 95



GTG CGG CAG AAC TTC ACC CCG GCT TCC ATA CAG CGG CAG ATC GCG GCC Val Arg Gln Asn Phe Thr Pro Ala Ser Ile Gln Arg Gln Ile Ala Ala	336		
100	105	110	
TTG TCC AAG GAT GAG CGC GAT ATT TTT CGT GGC TAT GCC GAT GGC TAT Leu Ser Lys Asp Glu Arg Asp Ile Phe Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr	384		
115	120	125	
AAC GCC TAT CTG GAG CAG GTG CGG CGT CGC CCT GAG TTG CTG CCC AAA Asn Ala Tyr Leu Glu Gln Val Arg Arg Arg Pro Glu Leu Leu Pro Lys	432		
130	135	140	
GAA TAT GTG GAT TTT GAT TTC CAG CCC GAG CCG CTG ACC GAC TTT GAT Glu Tyr Val Asp Phe Asp Phe Gln Pro Glu Pro Leu Thr Asp Phe Asp	480		
145	150	155	160
GTG GTC ATG ATC TGG GTG GGC TCC ATG GCC AAT CGC TTC TCC GAC ACG Val Val Met Ile Trp Val Gly Ser Met Ala Asn Arg Phe Ser Asp Thr	528		
165	170	175	
AAT CTG GAA GTG ACG GCA CTG GCC ATG CGT CAG TCT CTG GAG AAA CAG Asn Leu Glu Val Thr Ala Leu Ala Met Arg Gln Ser Leu Glu Lys Gln	576		
180	185	190	
CAC GGC CCG GAA CGA GGC CGT GCC TTG TTT GAT GAG CTG CTG TGG ATC His Gly Pro Glu Arg Gly Arg Ala Leu Phe Asp Glu Leu Leu Trp Ile	624		
195	200	205	
AAT GAC ACA ACA GCT CCC ACT ACG GTT CCG GCC CCC GCT GCC GAG CAC Asn Asp Thr Thr Ala Pro Thr Thr Val Pro Ala Pro Ala Ala Glu His	672		
210	215	220	
AAG CCG CAG GCA CAA GCA GGG ACG CAG GAT CTG GCT CAT GTT TCC TCG Lys Pro Gln Ala Gln Ala Gly Thr Gln Asp Leu Ala His Val Ser Ser	720		
225	230	235	240
CCA GTA CTG GCT ACC GAG CTA GAG CGC CAG GAC AAG CAC TGG GGC GGC Pro Val Leu Ala Thr Glu Leu Glu Arg Gln Asp Lys His Trp Gly Gly	768		
245	250	255	
CGT GGC CCG GAC TTC GCG CCC AAG GCT AGC AAC CTG TGG AGC ACT CGC Arg Gly Pro Asp Phe Ala Pro Lys Ala Ser Asn Leu Trp Ser Thr Arg	816		
260	265	270	
CCC GAG CGA GTG CAG GAG GGC TCG ACC GTA CTG ATC AAC GGC CCA CAG Pro Glu Arg Val Gln Glu Gly Ser Thr Val Leu Ile Asn Gly Pro Gln	864		
275	280	285	
TTT GGC TGG TAC AAC CCG GCC TAC ACC TAT GGC ATT GGC TTG CAT GGC Phe Gly Trp Tyr Asn Pro Ala Tyr Thr Tyr Gly Ile Gly Leu His Gly	912		
290	295	300	
GCC GGC TTC GAT GTG GTG GGT AAT ACG CCT TTT GCC TAT CCG ATC GTA Ala Gly Phe Asp Val Val Gly Asn Thr Pro Phe Ala Tyr Pro Ile Val	960		
305	310	315	320
CTG TTT GGC ACC AAT AGC GAG ATT GCC TGG GGG GCG ACT GCT GGC CCG Leu Phe Gly Thr Asn Ser Glu Ile Ala Trp Gly Ala Thr Ala Gly Pro	1008		
325	330	335	



CAA GAT GTG GTG GAC ATA TAT CAG GAA AAA TTG AAC CCC TCG CGT GCC 1056  
Gln Asp Val Val Asp Ile Tyr Gln Glu Lys Leu Asn Pro Ser Arg Ala  
340 345 350

GAT CAG TAC TGG TTC AAC AAT GCC TGG CGC ACG ATG GAG CAG CGC AAG 1104  
Asp Gln Tyr Trp Phe Asn Asn Ala Trp Arg Thr Met Glu Gln Arg Lys  
355 360 365

GAA CGT ATC CAG GTA CGC GGT CAG GCT GAT CGG GAA ATG ACG ATC TGG 1152  
Glu Arg Ile Gln Val Arg Gly Gln Ala Asp Arg Glu Met Thr Ile Trp  
370 375 380

CGC ACC GTG CAC GGC CCT GTG ATG CAG TTT GAT TAC GAT CAG GGC GCG 1200  
Arg Thr Val His Gly Pro Val Met Gln Phe Asp Tyr Asp Gln Gly Ala  
385 390 395 400

GCG TAC AGC AAG AAA CGC AGC TGG GAT GGC TAT GAG GTG CAG TCC TTG 1248  
Ala Tyr Ser Lys Lys Arg Ser Trp Asp Gly Tyr Glu Val Gln Ser Leu  
405 410 415

CTA GCC TGG TTG AAC GTG GCC AAG GCC CGC AAC TGG ACG GAG TTT CTG 1296  
Leu Ala Trp Leu Asn Val Ala Lys Ala Arg Asn Trp Thr Glu Phe Leu  
420 425 430

GAT CAA GCC AGC AAG ATG GCG ATT TCG ATC AAC TGG TAC TAC GCC GAC 1344  
Asp Gln Ala Ser Lys Met Ala Ile Ser Ile Asn Trp Tyr Tyr Ala Asp  
435 440 445

AAG CAC GGC AAT ATT GGT TAT GTC TCG CCG GCC TTC CTG CCC CAG CGT 1392  
Lys His Gly Asn Ile Gly Tyr Val Ser Pro Ala Phe Leu Pro Gln Arg  
450 455 460

CCT GCC GAT CAG GAC ATC CGT GTC CCT GCC AAG GGG GAT GGC AGC ATG 1440  
Pro Ala Asp Gln Asp Ile Arg Val Pro Ala Lys Gly Asp Gly Ser Met  
465 470 475 480

GAG TGG CTG GGC ATC AAG AGT TTC GAC GCG ATT CCC AAA GCC TAC AAT 1488  
Glu Trp Leu Gly Ile Lys Ser Phe Asp Ala Ile Pro Lys Ala Tyr Asn  
485 490 495

CCA CCC CAG GGC TAT CTG GTC AAC TGG AAC AAC AAG CCT GCG CCG GAC 1536  
Pro Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Trp Asn Asn Lys Pro Ala Pro Asp  
500 505 510

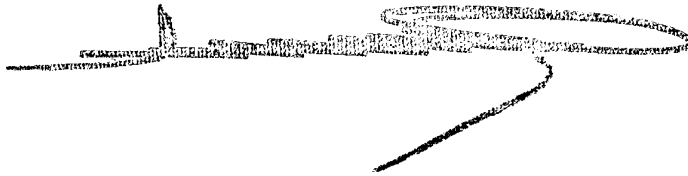
AAA ACC AAT ACG GAT ACT TAC TAT TGG ACC TAT GGC GAC CGC ATG AAT 1584  
Lys Thr Asn Thr Asp Thr Tyr Tyr Trp Thr Tyr Gly Asp Arg Met Asn  
515 520 525

GAA CTG GTC AGT CAG TAC CAG CAG AAA GAC CTC TTC AGT GTG CAG GAG 1632  
Glu Leu Val Ser Gln Tyr Gln Gln Lys Asp Leu Phe Ser Val Gln Glu  
530 535 540

ATC TGG GAG TTC AAT CAA AAA GCC TCC TAT AGC GAT GTG AAC TGG CGC 1680  
Ile Trp Glu Phe Asn Gln Lys Ala Ser Tyr Ser Asp Val Asn Trp Arg  
545 550 555 560

TAC TTC CGC CCA CAT CTG GAA AAG CTG GCG CAA CAG CTG CCG GCC GAC 1728  
Tyr Phe Arg Pro His Leu Glu Lys Leu Ala Gln Gln Leu Pro Ala Asp  
565 570 575

GAT AGC AGC AAG GCG GCG CTG ACG ATG TTG CTC GCC TGG GAT GGA ATG Asp Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Met Leu Leu Ala Trp Asp Gly Met 580 585 590	1776
GAA CAG GAT CAG GGA GGG CAA AAT GCC GGA CCG GCG CCG GTG CTC TTC Glu Gln Asp Gln Gly Gly Gln Asn Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu Phe 595 600 605	1824
AAG ACC TGG CTG GAA GAA ATG TAC AAG CAG GTC TTG ATG CCG GTG GTG Lys Thr Trp Leu Glu Glu Met Tyr Lys Gln Val Leu Met Pro Val Val 610 615 620	1872
CCT GAA TCG CAT CGC GCC ATG TAT AGC CAG ACT GGT TTT GCC ACG CAG Pro Glu Ser His Arg Ala Met Tyr Ser Gln Thr Gly Phe Ala Thr Gln 625 630 635 640	1920
CAA GGT CCC AAC CCC GGT TCC ATC AAC TTG AGC ATG GGC ACC AAG GTC Gln Gly Pro Asn Pro Gly Ser Ile Asn Leu Ser Met Gly Thr Lys Val 645 650 655	1968
TTG TTG CGT GCC TTG GTG CTG GAA GCC CAT CCC GAT CCC AAG CGT GTG Leu Leu Arg Ala Leu Val Leu Glu Ala His Pro Asp Pro Lys Arg Val 660 665 670	2016
AAT GTC TTT GGT GAG CGT TCG TCT CAG GAA ATC ATG CAC ACA GCT TTG Asn Val Phe Gly Glu Arg Ser Ser Gln Glu Ile Met His Thr Ala Leu 675 680 685	2064
CAA AAT GCG CAG GCC CGC TTG AGC CAG GAG CAG GGC GCT CAG ATG GCG Gln Asn Ala Gln Ala Arg Leu Ser Gln Glu Gln Gly Ala Gln Met Ala 690 695 700	2112
CGC TGG ACC ATG CCG ACC TCC GTG CAT CGT TTC AGC GAC AAG AAC TTC Arg Trp Thr Met Pro Thr Ser Val His Arg Phe Ser Asp Lys Asn Phe 705 710 715 720	2160
ACG GGA ACC CCG CAG ACG ATG CCT GGC AAT ACC TTT GCC TTT ACC GGC Thr Gly Thr Pro Gln Thr Met Pro Gly Asn Thr Phe Ala Phe Thr Gly 725 730 735	2208
TAT CAG AAT CGA GGC ACG GAA AAT AAC CGC GTG GTG TTT GAT GCC AAG Tyr Gln Asn Arg Gly Thr Glu Asn Asn Arg Val Val Phe Asp Ala Lys 740 745 750	2256
GGC GTG GAG TTC TGC GAC GCC ATG CCG CCC GGC CAA AGC GGT TTC ACC Gly Val Glu Phe Cys Asp Ala Met Pro Pro Gly Gln Ser Gly Phe Thr 755 760 765	2304
GAC CGC AAT GGA GTG CGC AGC CCG CAT TAT GAG GAT CAG CTG AAG TTG Asp Arg Asn Gly Val Arg Ser Pro His Tyr Glu Asp Gln Leu Lys Leu 770 775 780	2352
TAC GAG AAC TTC GAG TGC AAG ACG ATG GAT GTG ACG CAT GCG GAC ATT Tyr Glu Asn Phe Glu Cys Lys Thr Met Asp Val Thr His Ala Asp Ile 785 790 795 800	2400
CGT CGT AAT GCG CAA AGC AGC ACG ATG CTG TTG ATT CAG CCT CAG CCT Arg Arg Asn Ala Gln Ser Ser Thr Met Leu Leu Ile Gln Pro Gln Pro 805 810 815	2448
TAA End	2451



e recuperar-se em seguida a forma isolada de penicilina G acilase.

Lista de Sequência Nº.1

SEQ. Nº.:1

TIPO DE SEQUÊNCIA: nucleótido com a proteína correspondente

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 2451 pares base

NÚMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: genômica

ORGANISMO: *Alcaligenes faecalis*

CARACTERÍSTICAS: de péptido com 1 a 2451 pb

PROPRIEDADES: gene codificando penicilina acilase

ATG CAG AAA GGG CTT GIT CGT ACC GGG CTT GTG GCC GCT GGT TTG ATC	48
Met Gln Lys Gly Leu Val Arg Thr Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu Ile	
1 5 10 15	
TTG GGT TGG GCG GGG GCA CCG ACC CAC GCG CAA GTG CAG TCG GTA GAG	96
Leu Gly Trp Ala Gly Ala Pro Thr His Ala Gln Val Gln Ser Val Glu	
20 25 30	
GTG ATG CGG GAC AGT TAT GGC GTG CCG CAC GTC TTT GCC GAC AGC CAC	144
Val Met Arg Asp Ser Tyr Gly Val Pro His Val Phe Ala Asp Ser His	
35 40 45	
TAT GGC TTG TAT TAC GGC TAT GGT TAT GCG GTC GCC CAA GAC CGT CTG	192
Tyr Gly Leu Tyr Tyr Gly Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Gln Asp Arg Leu	
50 55 60	
TTC CAG ATG GAC ATG GCG CGT CGC TCC TTT GTC GGC ACA ACC GCC GCC	240
Phe Gln Met Asp Met Ala Arg Arg Ser Phe Val Gly Thr Thr Ala Ala	
65 70 75 80	
GTC TTA GGC CCT GGT GAG CAA GAT GCC TAC GTC AAG TAC GAC ATG CAG	288
Val Leu Gly Pro Gly Glu Gln Asp Ala Tyr Val Lys Tyr Asp Met Gln	
85 90 95	
GTG CGG CAG AAC TTC ACC CCG GCT TCC ATA CAG CGG CAG ATC GCG GCC	336
Val Arg Gln Asn Phe Thr Pro Ala Ser Ile Gln Arg Gln Ile Ala Ala	
100 105 110	
TTG TCC AAG GAT GAG CGC GAT ATT TTT CGT GGC TAT GCC GAT GGC TAT	384
Leu Ser Lys Asp Glu Arg Asp Ile Phe Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr	
115 120 125	
AAC GCC TAT CTG GAG CAG GTG CCG CGT CGC CCT GAG TTG CTG CCC AAA	432
Asn Ala Tyr Leu Glu Gln Val Arg Arg Arg Pro Glu Leu Leu Pro Lys	
130 135 140	
GAA TAT GTG GAT TTT GAT TTC CAG CCC GAG CCG CTG ACC GAC TTT GAT	480
Glu Tyr Val Asp Phe Asp Phe Gln Pro Glu Pro Leu Thr Asp Phe Asp	
145 150 155 160	
GTG GTC ATG ATC TGG GTG GGC TCC ATG GCC AAT CGC TTC TCC GAC ACG	528
Val Val Met Ile Trp Val Gly Ser Met Ala Asn Arg Phe Ser Asp Thr	
165 170 175	

Lista de Sequência Nº. 1 (continuação)

AAT	CTG	GAA	GTG	ACG	GCA	CTG	GCC	ATG	CGT	CAG	TCT	CTG	GAG	AAA	CAG	576
Asn	Leu	Glu	Val	Thr	Ala	Leu	Ala	Met	Arg	Gln	Ser	Leu	Glu	Lys	Gln	
			180					185					190			
CAC	GGC	CCG	GAA	CGA	GGC	CGT	GCC	TTG	TTT	GAT	GAG	CTG	CTG	TGG	ATC	624
His	Gly	Pro	Glu	Arg	Gly	Arg	Ala	Leu	Phe	Asp	Glu	Leu	Leu	Trp	Ile	
		195					200					205				
AAT	GAC	ACA	ACA	GCT	CCC	ACT	ACG	GTT	CCG	GCC	CCC	GCT	GCC	GAG	CAC	672
Asn	Asp	Thr	Thr	Ala	Pro	Thr	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Glu	His	
	210					215					220					
AAG	CCG	CAG	GCA	CAA	GCA	GGG	ACG	CAG	GAT	CTG	GCT	CAT	GTT	TCC	TCG	720
Lys	Pro	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Gln	Asp	Leu	Ala	His	Val	Ser	Ser	
	225				230					235					240	
CCA	GTA	CTG	GCT	ACC	GAG	CTA	GAG	CGC	CAG	GAC	AAG	CAC	TGG	GGC	GGC	768
Pro	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Leu	Glu	Arg	Gln	Asp	Lys	His	Trp	Gly	Gly	
				245					250					255		
CGT	GGC	CCG	GAC	TTC	GCG	CCC	AAG	GCT	AGC	AAC	CTG	TGG	AGC	ACT	CGC	816
Arg	Gly	Pro	Asp	Phe	Ala	Pro	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	Trp	Ser	Thr	Arg	
			260					265						270		
CCC	GAG	CGA	GTG	CAG	GAG	GGC	TCG	ACC	GTA	CTG	ATC	AAC	GGC	CCA	CAG	864
Pro	Glu	Arg	Val	Gln	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Leu	Ile	Asn	Gly	Pro	Gln	
		275					280					285				
TTT	GGC	TGG	TAC	AAC	CCG	GCC	TAC	ACC	TAT	GGC	ATT	GGC	TTG	CAT	GGC	912
Phe	Gly	Trp	Tyr	Asn	Pro	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Ile	Gly	Leu	His	Gly	
	290					295					300					
GCC	GGC	TTC	GAT	GTG	GTG	GGT	AAT	ACG	CCT	TTT	GCC	TAT	CCG	ATC	GTA	960
Ala	Gly	Phe	Asp	Val	Val	Gly	Asn	Thr	Pro	Phe	Ala	Tyr	Pro	Ile	Val	
	305				310					315					320	
CTG	TTT	GGC	ACC	AAT	AGC	GAG	ATT	GCC	TGG	GGG	GCG	ACT	GCT	GGC	CCG	1008
Leu	Phe	Gly	Thr	Asn	Ser	Glu	Ile	Ala	Trp	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Pro	
				325					330					335		
CAA	GAT	GTG	GTG	GAC	ATA	TAT	CAG	GAA	AAA	TTG	AAC	CCC	TCG	CGT	GCC	1056
Gln	Asp	Val	Val	Asp	Ile	Tyr	Gln	Glu	Lys	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Ala	
			340					345					350			
GAT	CAG	TAC	TGG	TTC	AAC	AAT	GCC	TGG	CGC	ACG	ATG	GAG	CAG	CGC	AAG	1104
Asp	Gln	Tyr	Trp	Phe	Asn	Asn	Ala	Trp	Arg	Thr	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	
		355					360					365				
GAA	CGT	ATC	CAG	GTA	CGC	GGT	CAG	GCT	GAT	CGG	GAA	ATG	ACG	ATC	TGG	1152
Glu	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Gly	Gln	Ala	Asp	Arg	Glu	Met	Thr	Ile	Trp	
	370					375					380					
CGC	ACC	GTG	CAC	GGC	CCT	GTG	ATG	CAG	TTT	GAT	TAC	GAT	CAG	GGC	GCG	1200
Arg	Thr	Val	His	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Phe	Asp	Tyr	Asp	Gln	Gly	Ala	
	385				390					395					400	

Lista de Sequência Nº. 1 (continuação)

GCG TAC AGC AAG AAA CGC AGC TGG GAT GGC TAT GAG GTG CAG TCC TTG	1248
Ala Tyr Ser Lys Lys Arg Ser Trp Asp Gly Tyr Glu Val Gln Ser Leu	
405 410 415	
CTA GCC TGG TTG AAC GTG GCC AAG GCC CGC AAC TGG ACG GAG TTT CTG	1296
Leu Ala Trp Leu Asn Val Ala Lys Ala Arg Asn Trp Thr Glu Phe Leu	
420 425 430	
GAT CAA GCC AGC AAG ATG GCG ATT TCG ATC AAC TGG TAC TAC GCC GAC	1344
Asp Gln Ala Ser Lys Met Ala Ile Ser Ile Asn Trp Tyr Tyr Ala Asp	
435 440 445	
AAG CAC GGC AAT ATT GGT TAT GTC TCG CCG GCC TTC CTG CCC CAG CGT	1392
Lys His Gly Asn Ile Gly Tyr Val Ser Pro Ala Phe Leu Pro Gln Arg	
450 455 460	
CCT GCC GAT CAG GAC ATC CGT GTC CCT GCC AAG GGG GAT GGC AGC ATG	1440
Pro Ala Asp Gln Asp Ile Arg Val Pro Ala Lys Gly Asp Gly Ser Met	
465 470 475 480	
GAG TGG CTG GGC ATC AAG AGT TTC GAC GCG ATT CCC AAA GCC TAC AAT	1488
Glu Trp Leu Gly Ile Lys Ser Phe Asp Ala Ile Pro Lys Ala Tyr Asn	
485 490 495	
CCA CCC CAG GGC TAT CTG GTC AAC TGG AAC AAC AAG CCT GCG CCG GAC	1536
Pro Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Trp Asn Asn Lys Pro Ala Pro Asp	
500 505 510	
AAA ACC AAT ACG GAT ACT TAC TAT TGG ACC TAT GGC GAC CGC ATG AAT	1584
Lys Thr Asn Thr Asp Thr Tyr Tyr Trp Thr Tyr Gly Asp Arg Met Asn	
515 520 525	
GAA CTG GTC AGT CAG TAC CAG CAG AAA GAC CTC TTC AGT GTG CAG GAG	1632
Glu Leu Val Ser Gln Tyr Gln Gln Lys Asp Leu Phe Ser Val Gln Glu	
530 535 540	
ATC TGG GAG TTC AAT CAA AAA GCC TCC TAT AGC GAT GTG AAC TGG CGC	1680
Ile Trp Glu Phe Asn Gln Lys Ala Ser Tyr Ser Asp Val Asn Trp Arg	
545 550 555 560	
TAC TTC CGC CCA CAT CTG GAA AAG CTG GCG CAA CAG CTG CCG GCC GAC	1728
Tyr Phe Arg Pro His Leu Glu Lys Leu Ala Gln Gln Leu Pro Ala Asp	
565 570 575	
GAT AGC AGC AAG GCG GCG CTG ACG ATG TTG CTC GCC TGG GAT GGA ATG	1776
Asp Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Met Leu Leu Ala Trp Asp Gly Met	
580 585 590	
GAA CAG GAT CAG GGA GGG CAA AAT GCC GGA CCG GCG CGG GTG CTC TTC	1824
Glu Gln Asp Gln Gly Gly Gln Asn Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu Phe	
595 600 605	
AAG ACC TGG CTG GAA GAA ATG TAC AAG CAG GTC TTG ATG CCG GTG GTG	1872
Lys Thr Trp Leu Glu Glu Met Tyr Lys Gln Val Leu Met Pro Val Val	
610 615 620	



Lista de Sequência Nº. 2

SEQ. Nº.: 2

TIPO DE SEQUÊNCIA: fragmento sintético de nucleótido

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 124 pares base

NÚMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: sintética

CARACTERÍSTICAS: pb 35-40 = "-35" região

pb 57-62 = "-10" região

pb 110-114 = gene Shine Dalgarno lac

PROPRIEDADES: actividade promotora (promotor tac)

GAATTCGAGC TCGAGCTTAC TCCCATCCC CCTGTTGACA ATTAATCATC GGCTCGTATA 60  
ATGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGGATCCA AGGAAAAACA 120  
TATG 124



Lista de Sequência Nº. 3

SEQ. Nº: 3

TIPO DE SEQUÊNCIA: fragmento sintético de nucleótido

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 151 pares base

NÚMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: genômica

CARACTERÍSTICAS: pb 84-89 = "-35"

pb 107-112 = "-10"

pb 134-139 = Shine Dalgarno

PROPRIEDADES: actividade promotora (promotor trp)

GAATTCAAGG CGCACTCCCG TTCTGGATAA TGTTTTTTTGC GCCGACATCA TAACGGTTCT 60  
GGCAAATATT CTGAAATGAG CTGTTGACAA TTAATCATCG AACTAGTTAA CTAGTACGCA 120  
AGTTCACGTA AAAAGGAGGT ATCGACATAT G 151

Lista de Sequência Nº.4

SEQ. Nº.: 4

TIPO DE SEQUÊNCIA: fragmento sintético de nucleótido

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 114 pares base

NÚMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: genômica

CARACTERÍSTICAS: pb 23-28 = "-35"

pb 46-51 = "-10"

pb 100-103 = Shine Dalgarno p78

PROPRIEDADES: actividade promotora (promotor pf3)

GAAATCGATC GCAAAAAAGT ACTTGCAAGT TCCCGAAACC CTGTCTAGAG TTCTAGGTGC 60

ATCTGAATGG AGCTCGGTAC CAATCTGTTT GCTTCCATTG AGGTGCATCA TATG 114

Lista de Sequência Nº. 5

SEQ. Nº: 5

TIPO DE SEQUÊNCIA: fragmento sintético nucleótido

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 105 pb

NÚMERO DE BANDAS: única

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: genómica

CARACTERÍSTICAS: pb 23-28 = "-35"

pb 46-51 = "-10"

pb 92-95 - gene Shine Dalgarno lac

PROPRIEDADES: actividade promotora (promotor pf3)

GAATTCGATC GCAAAAAAGT ACTTGCAAGT TCCCGAAACC CTGTCTAGAG TTCTAGGTGC 60

ATCTGAATGG AGCTCGGTAC CCGGGGATCC AAGGAAAAAC ATATG 105

AFpac

(6400 pb)

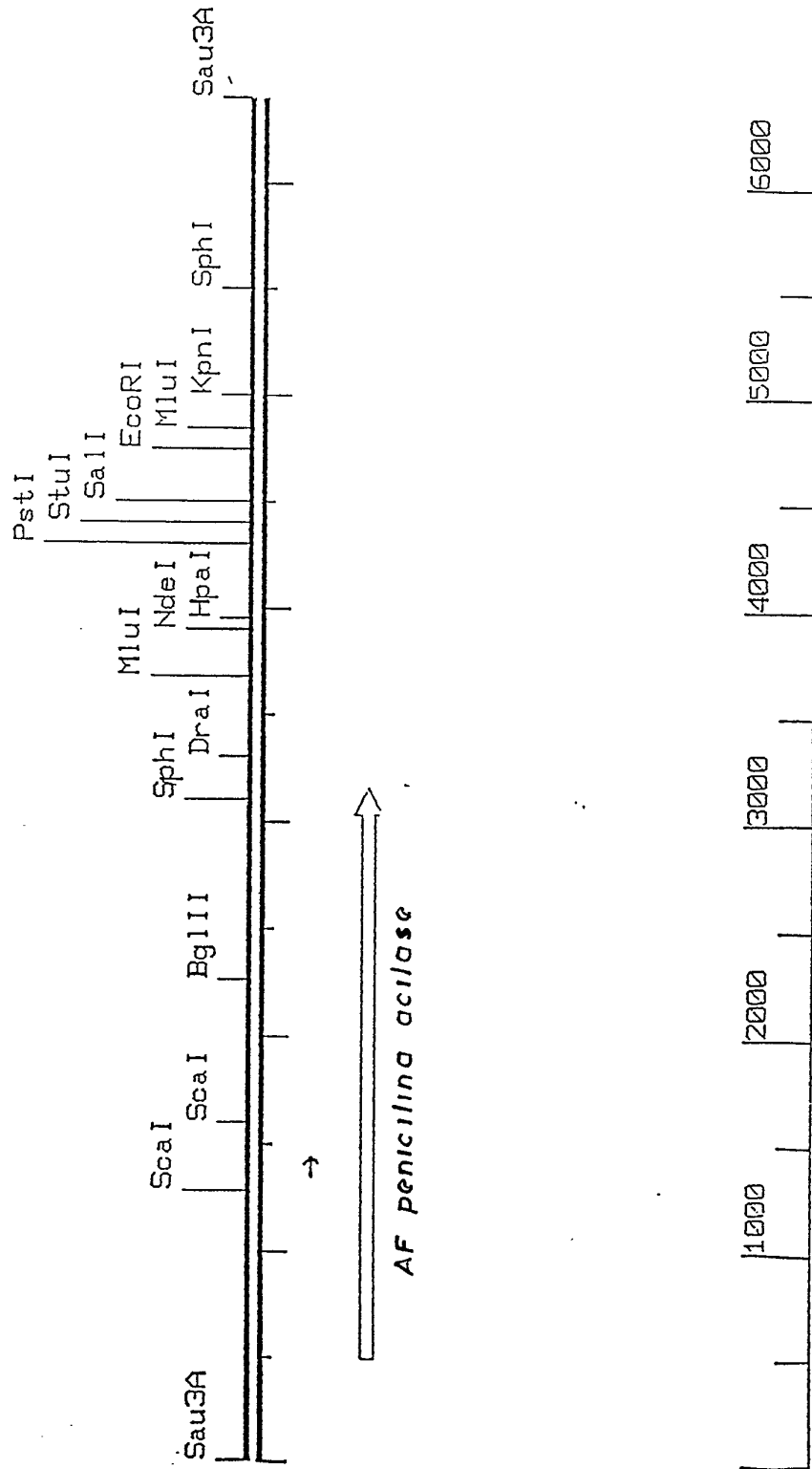


Fig. 1

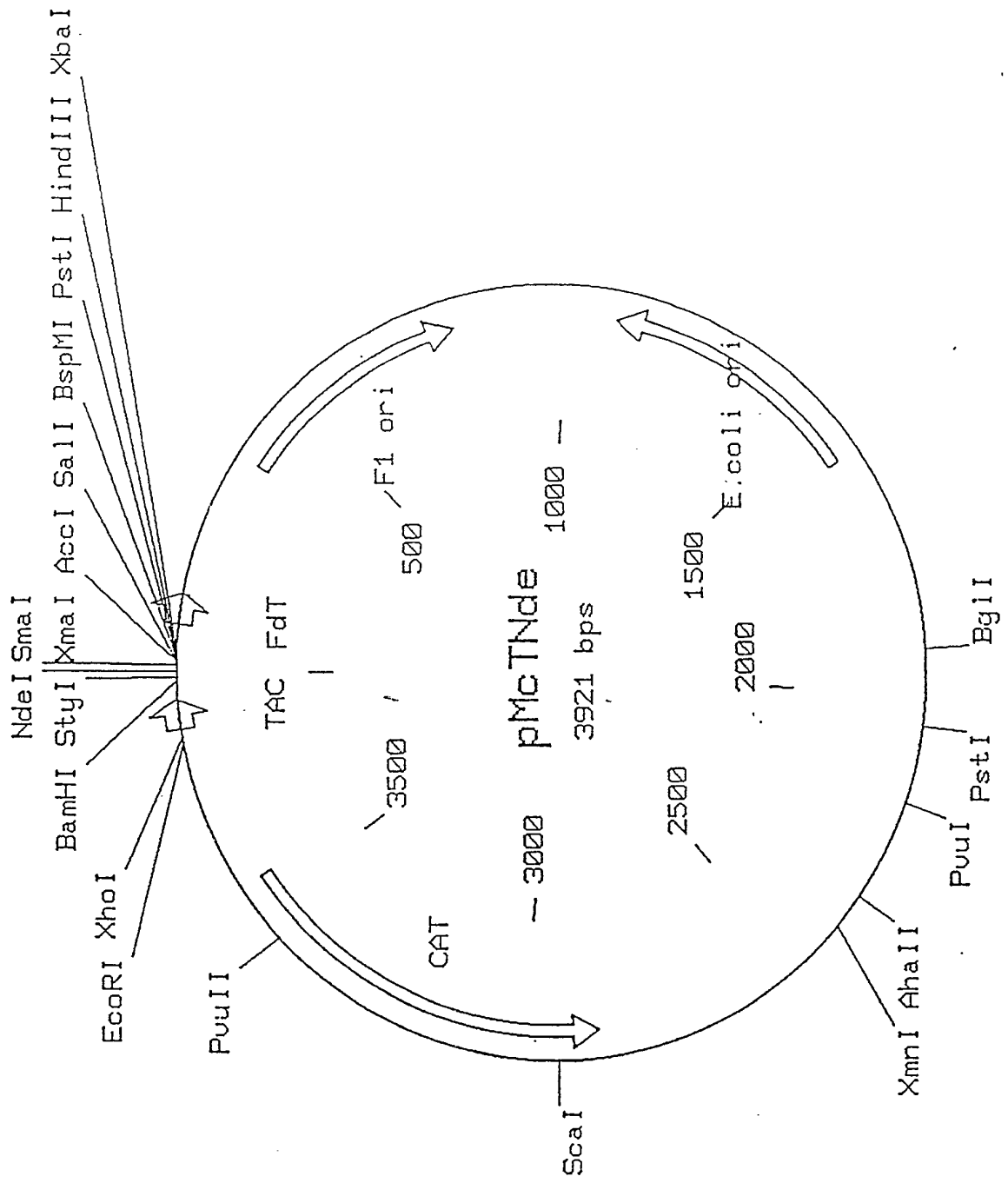


Fig.2

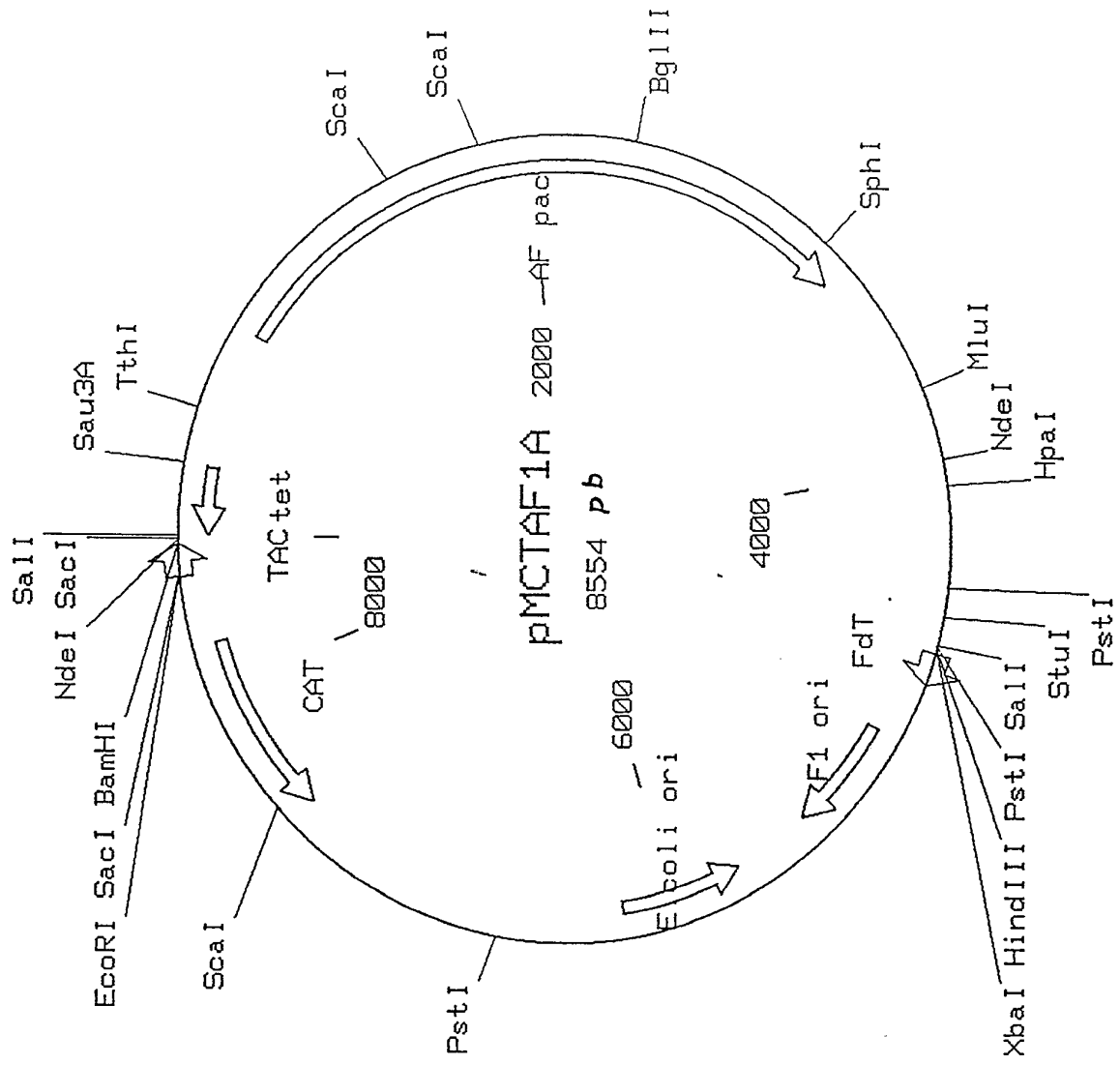


Fig. 3

tac-P

(124 P b)

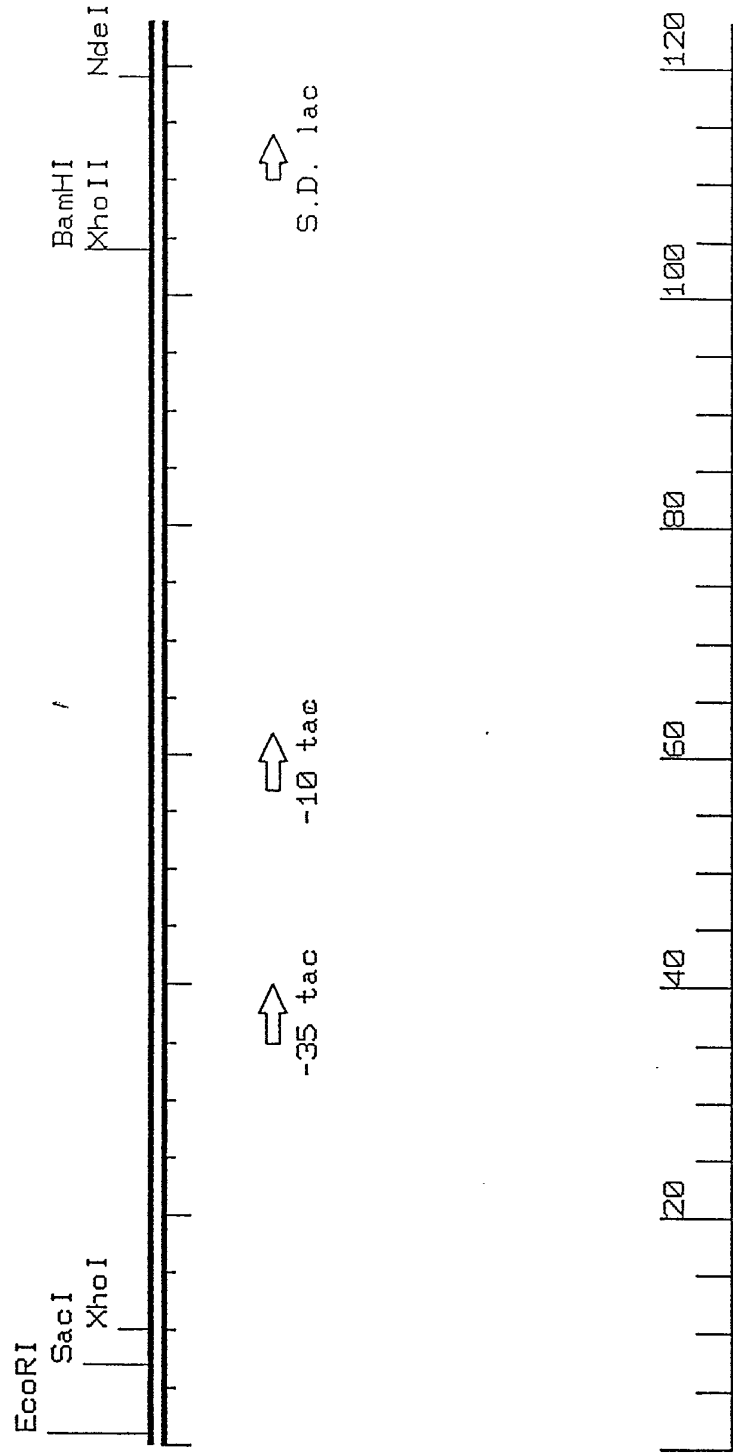


Fig 4

trp-P

(151 pb)

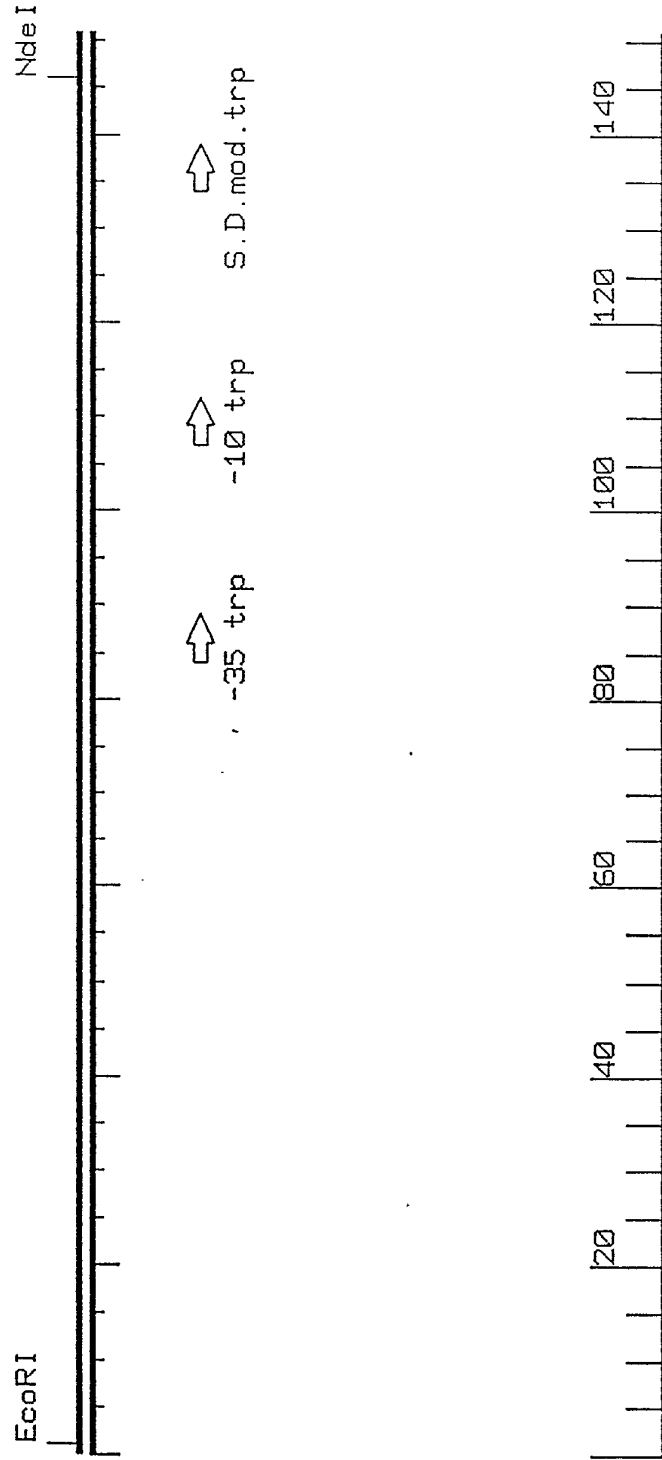


Fig 5



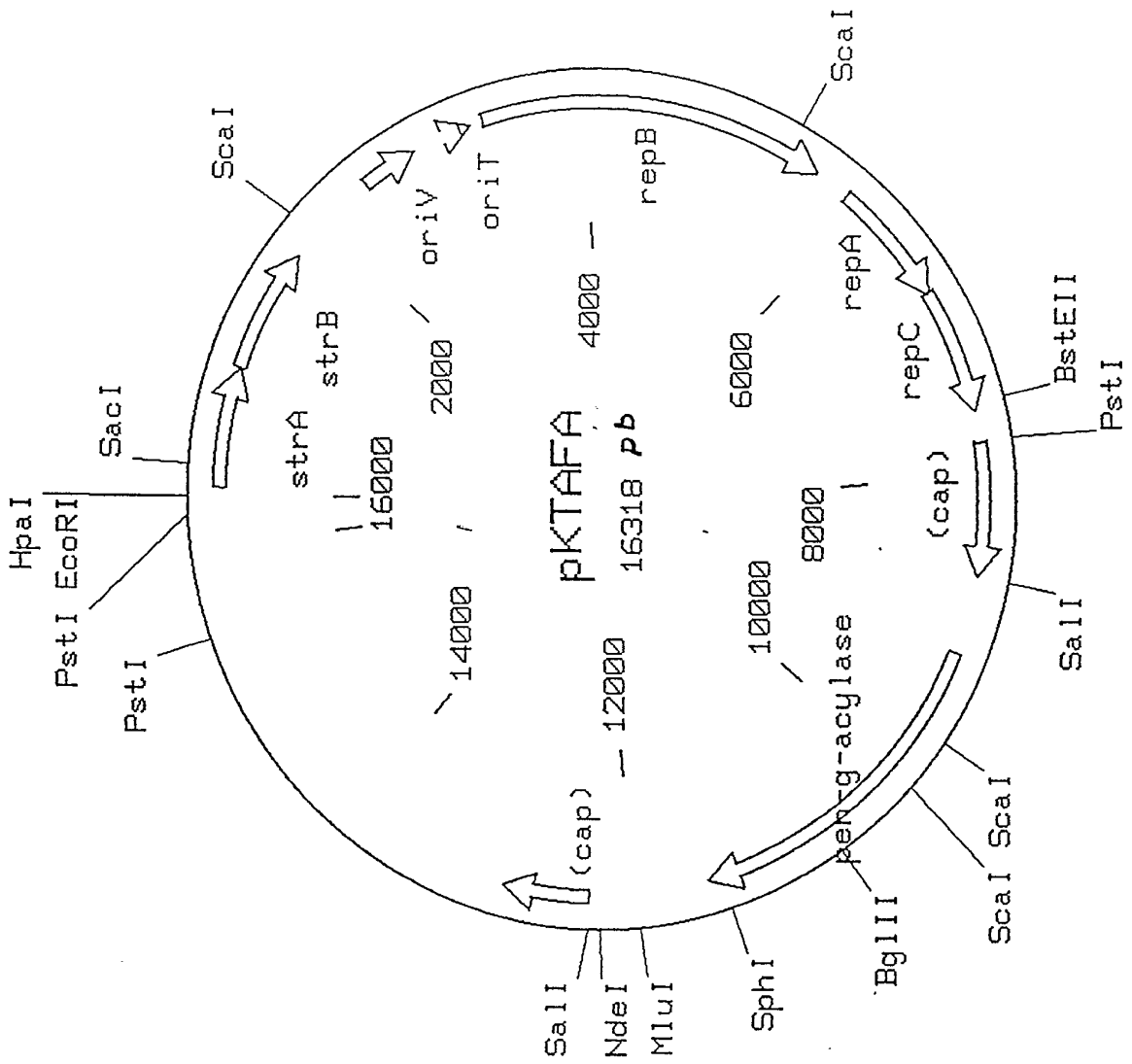


Fig. 6

p78-P

(114 pb)

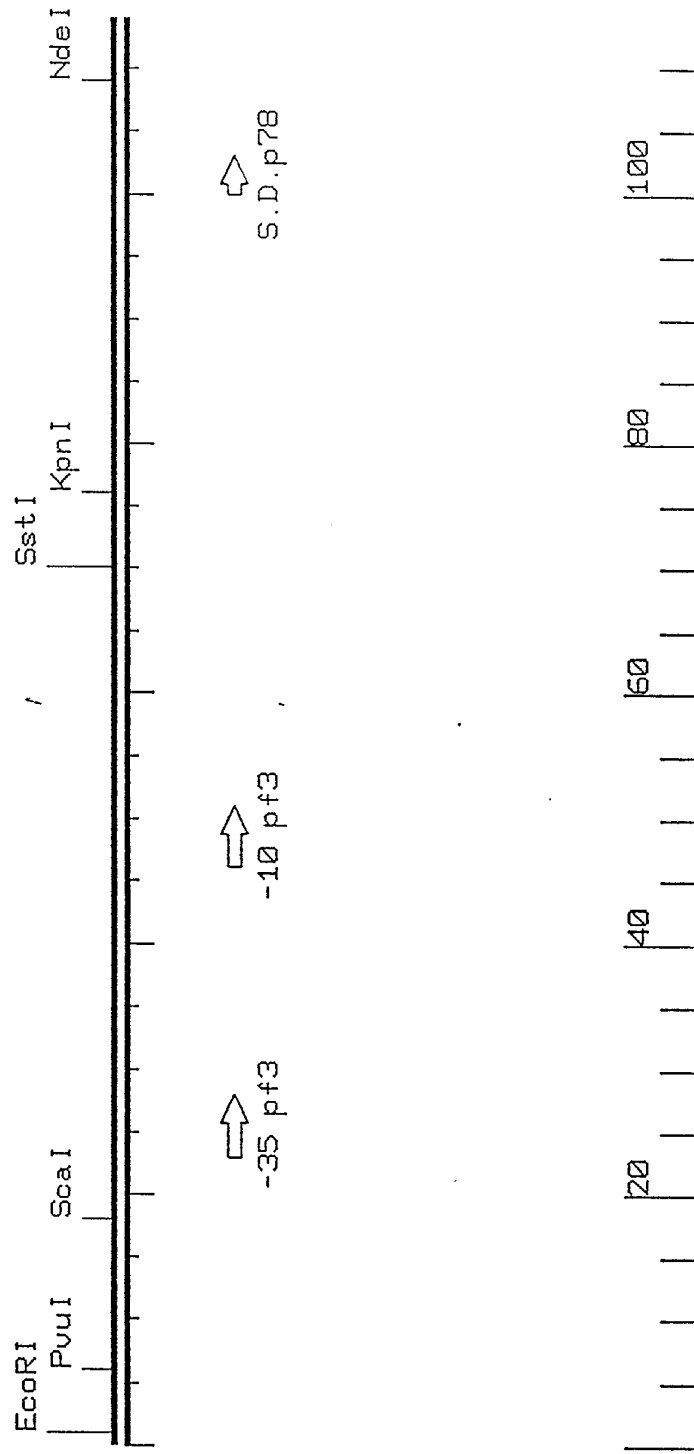


Fig.7



pf3-p

(106 pb)

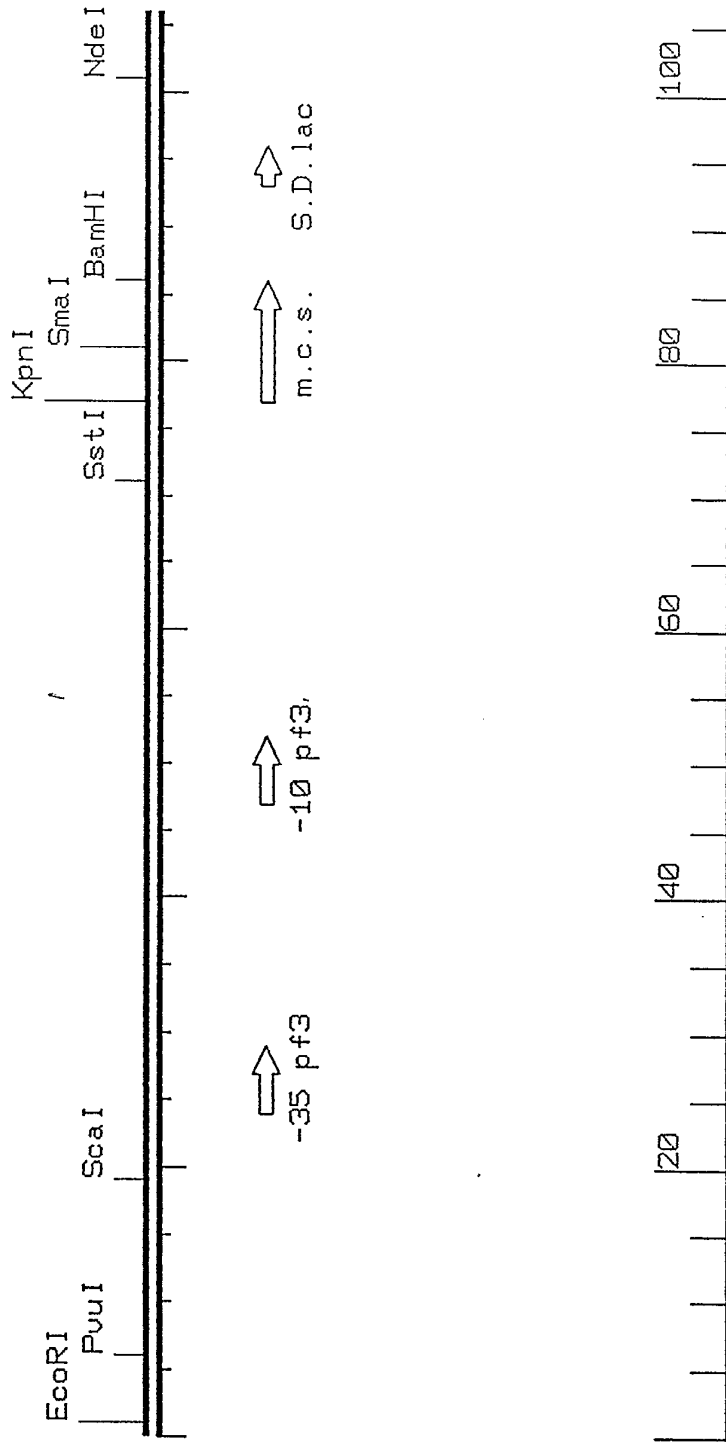


Fig. 8