

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

(11) (21) **PI 0501517-0 A**



(22) Data de Depósito: 15/04/2005
(43) Data de Publicação: 12/12/2006
(RPI 1875)

(51) Int. Cl⁷.:
C12N 1/21
C12N 15/29
C12N 15/70
C12N 15/74
C12N 15/79
C12R 1/19

(54) Título: **CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO EM E.COLI DA FASTUOSAINA**

(71) Depositante(s): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (BR/SP) , Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP (BR/SP)

(72) Inventor(es): Hamilton Cabral, Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, Andréia Machado Leopoldino, Eloiza Helena Tajara da Silva

(74) Procurador: Cruzeiro/Newmarc Patentes e Marcas Ltda.

(57) Resumo: "CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO EM E. COLI DA FASTUOSAINA". A presente invenção refere-se à clonagem e expressão da peptidase Fastuosaina, encontrada na natureza no fruto da Bromelia fastuosa, pela bactéria E. coli, podendo ser expressa por outros organismos procariontes ou eucariontes.

	1	10	20	30	40	50	60
fastuosainaselvagen	[-----]						
fastuosainarecombina	NYPQSTDAHAYGATTSYKMSGSCGSCAFSAITIVETIKYKAGMISLSEGEVLDC						
Consensus	...NYPQSTDAHAYGATTSYKMSGSCGSCAFSAITIVETIKYKAGMISLSEGEVLDC						
	61	70	80	90	100	110	120
fastuosainaselvagen	[-----]						
fastuosainarecombina	RASYGEGGAPKQKQVETISMGSTSHRPRKYNKGFCHNDLPRETTKVVYQSH						
Consensus	RASYGEGGAPKQKQVETISMGSTSHRPRKYNKGFCHNDLPRETTKVVYQSH						
	121	136	146	156	166	170	180
fastuosainaselvagen	[-----]						
fastuosainarecombina	EPKRLVHNPPTIARLDRGGHGYKSGVIGGCLISLHAEIVIGGATSSGTRYKIV						
Consensus	EPKRLVHNPPTIARLDRGGHGYKSGVIGGCLISLHAEIVIGGATSSGTRYKIV						
	181	190	200	210	220		
fastuosainaselvagen	[-----]						
fastuosainarecombina	KESAGTSAGRGVTRHRRPSSPGLCGDHRAPLPIHQS						
Consensus	KESAGTSAGRGVTRHRRPSSPGLCGDHRAPLPIHQS						

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
"CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO EM E. COLI DA FASTUOSAINA"

A presente invenção refere-se à clonagem e à expressão da peptidase Fastuosaina, encontrada na natureza no fruto da *Bromelia fastuosa*, pela bactéria *E. coli*, podendo ser expressa por outros organismos procariontes ou eucariontes.

As cisteíno peptidases, Ficina, Bromelina do Fruto e do Talo e a Papaína são extraídas de frutos tropicais, e largamente usadas no processamento de alimentos, na indústria farmacêutica, (Caygill, 1979), e na biotecnologia, (Cabral, et al., 2000).

Em comparação com a pepsina, tripsina ou peptidases bacterianas, o custo das peptidases de vegetais, restringe suas aplicações para aquelas situações nas quais sua elevada atividade e especificidade as tornam, particularmente apropriadas, (Caygill, 1979).

As peptidases das plantas rapidamente hidrolisam somente ligações peptídicas nas proteínas (substrato), o que faz com que este grupo de enzimas seja particularmente apropriada para aplicações quanto à proteólise, (Caygill, 1979).

Esta pequena introdução fornece uma pequena idéia da utilização das peptidases; outras aplicações foram descritas nos artigos de Rao, et al., (1998), Maurer, (2001), e Cabral, et al., (2000).

Pode-se observar o grande campo de aplicação de peptidases e um campo para apresentar novas enzimas que apresentam diferentes características físico-químicas daquelas que já se encontram no mercado. Isto abre novas fontes para as aplicações das peptidases, além das divisas que podem vir para o país, visto que, o consumo mundial dessas enzimas é muito grande; um exemplo é a empresa Suíça Novoenzyme, (<http://www.novoenzyme.com>), a maior empresa que comercializa enzimas no mundo.

Dada a grande importância econômica das peptidases, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e biotecnologia e agora em aplicações para despoluição do meio ambiente, esta invenção apresenta uma nova enzima ao potencial

mercado de enzimas, já clonada e expressando em *E. coli*, a Fastuosaina recombinante (Fast-rec).

5 A peptidase Fastuosaina selvagem (extraída do fruto), apresenta um grande potencial de aplicação, na indústria alimentícia, farmacológica e biotecnologia (Cabral, et al., 2000).

Além das aplicações da Fastuosaina selvagem citadas, está-se fazendo contato com alguns laboratórios de análises clínicas, para o fornecimento desta peptidase para avaliar sua eficiência na substituição da Bromelina que é
10 utilizada na tipagem dos grupos sanguíneos.

Com base nos resultados da aplicação da Fastuosaina selvagem, e como a Fastuosaina recombinante tem sua atividade catalítica preservada (ver resultados), pode-se supor que esta enzima recombinante pode vir a substituir a Fastuosaina
15 selvagem, já que para uma produção em alta escala, as enzimas têm que estar sendo expressas em bactérias ou leveduras, para aumentar a quantidade e não ficar sujeita às intempéries do clima, o que pode acarretar a não produção necessária para atender o mercado, podendo assim ser vendida para empresas interessadas.

20 A metodologia para a obtenção da Fastuosaina recombinante (Fast-rec) foi:

1- Extração do RNA total do fruto de *B. fastuosa*: foi realizada utilizando o reagente Trizol LS (Invitrogen) segundo o protocolo descrito pelo fabricante.

25 2- Análise da qualidade e quantidade de RNA total obtido foi avaliada por eletroforese em gel 2 % de agarose e espectrofotômetro, respectivamente. A qualidade foi satisfatória sendo possível a observação das subunidades maior e menor do RNA. A quantidade de RNA obtida foi cerca de 2µg/µl.

30 3- A síntese do cDNA foi realizada a partir do mRNA total utilizando o kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) segundo protocolo do fabricante. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 1 e a temperatura de anelamento foi de 55°C.

35 Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem de fastuosaina recombinante (Fast-rec)

Nome do iniciador	Seqüência (5'-3')
RFNheI	TCAACGCTAGCGCAGTGCCTCAAAGTATTGATTGG
RFBamHI	CCGCGGATCCTCACGATTGCAGAGTGGGAAAGAGGG

4- A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel 1 % de agarose e por seqüenciamento direto utilizando o seqüenciador automático de DNA ABI377 (Applied Biosystems). A reação de seqüenciamento foi feita utilizando-se: 2 µl do kit Big Dye (Applied Biosystems), 3,2 µM de iniciador RFNheI, 180ng de DNA (do fragmento amplificado e purificado utilizando o kit QIAquick Gel Extraction -QIAGEN) e reação de seqüenciamento de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems).

5- Digestão do fragmento Fast-rec com a primeira enzima de restrição NheI utilizando 1 U da enzima/ 1µg de DNA, à temperatura de 37°C por 2 horas.

6- Purificação do fragmento após primeira clivagem utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), segundo protocolo do fabricante.

7- Digestão do fragmento Fast-rec com a segunda enzima de restrição BamHI utilizando 1 U da enzima/ 1µg de DNA, à temperatura de 37°C por 2 horas.

8- O procedimento de purificação foi repetido conforme descrito no item 6.

9- Para a preparação do vetor de expressão pET23a foi realizada a digestão separadamente, com a enzima de restrição NheI e com a BamHI. Após cada digestão foi realizada a purificação do DNA segundo descrito no item 6.

10- Em seguida, o fragmento Fast-rec e o vetor, digeridos e purificados, foram submetidos a reação de ligação utilizando T₄ DNA ligase (Biolabs), segundo recomendações do fabricante.

11- O DNA recombinante (Fast-rec + pET23a) foi introduzido na bactéria *E. coli* (BL21(DE3)pLys), células quimicamente competentes.

12- Na seleção dos clones contendo o DNA Fast-rec foram identificados pela PCR com os iniciadores específicos para o fragmento de interesse.

13- Foram selecionados alguns clones para o seqüenciamento (reação descrita no item 4).

14- Após a confirmação do DNA rec contendo o inserto com a seqüência correta, foram feitos os testes de expressão.

15- A melhor condição para expressão da proteína recombinante Fast-rec foi obtida em meio LB com 1mM de IPTG, 250rpm, à temperatura de 28°C a 37°C, por 3 horas.

16- A cultura de bactérias após indução da expressão foi centrifugada a 10.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de células ressuspenso em tampão Hepes 50mM com 5mM EDTA e 150mM de NaCl, pH 7,50 e submetido a sonicação (3 pulsos de 70 % por 15 s cada; (Ultrasonic - Fisher)).

A identificação da fração contendo a Fast-rec foi feita com base na atividade enzimática, (resultados). Uma vez, identificada a fração, a amostra foi analisada por SDS-PAGE 12 %, corado com nitrato de prata.

Quando realizadas as quantificações de proteínas totais e atividade específica da enzima, obtiveram-se 47,5µg/µL de proteínas totais e atividade específica de 591u.a./µg/µL de extrato bruto (lisado celular).

Para os ensaios de determinação de pH ótimo, foi utilizado o tampão Hepes 50mM nos seguintes pHs: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e o tampão Mes 50mM nos seguintes pHs: 8,0; 8,5 e 9,0. O substrato utilizado foi a caseína a 1% dissolvida nos respectivos pHs.

Também foram realizados experimentos de atividade catalítica na presença do agente desnaturante uréia, em várias concentrações, previamente dissolvida no tampão Hepes 50mM, pH 7,50, utilizando como substrato a caseína a 1%.

A enzima Fast-rec também foi submetida a experimento onde foi variada a concentração de Cloreto de Sódio (NaCl), para se observar o quanto este sal interfere na atividade catalítica desta enzima. Foi utilizada como substrato para medir a atividade catalítica deste experimento a caseína a 1%.

A Fast-rec também foi submetida a teste de estabilidade térmica, para se averiguar quanto tempo a Fast-rec suporta em uma determinada temperatura.

A enzima foi incubada a 25, 37, 45 e 55°C, nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 120 e 180 minutos. Logo depois foi realizado o experimento da atividade catalítica incubando a enzima a 37°C, utilizando como substrato a caseína a 1%.

No experimento de temperatura ótima, foram incubados a enzima com o substrato caseína a 1%, nas seguintes temperaturas 25, 37, 45, 55, 65 e 75°C.

Fazem parte do presente pedido as seguintes figuras:

- A figura 1 mostra a foto de um gel de agarose a 2%, mostrando as duas bandas do RNA total (28 e 18s), extraído dos frutos verdes da *Bromelia fastuosa*, utilizado para realizar a clonagem na bactéria *E. coli*, depois de realizar a amplificação através da técnica de cDNA, da região gênica de interesse.

- A figura 2 mostra o alinhamento do cDNA da Fastuosaina selvagem madura e da Fastuosaina recombinante. Pode-se observar que a inserção de 9 nucleotídeos gerou a modificação do gene da enzima selvagem.

- A figura 3 mostra o alinhamento dos aminoácidos da Fastuosaina selvagem madura e da Fastuosaina recombinante. Devido à inserção de 9 nucleotídeos, podemos observar a adição de três (3) resíduos de aminoácidos (Met (M), Ala (A) e Ser (S)) na Fastuosaina recombinante, o que a diferencia da Fastuosaina selvagem.

- A figura 4 mostra a foto de um gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata, indicando a presença da enzima sendo expressa pela bactéria *E. coli*, (canaleta 2), e a enzima selvagem (canaleta 1).

- A figura 5 mostra o gráfico da determinação do pH ótimo da enzima Fast-rec, utilizando como substrato a caseína a 1 %. A enzima em questão mostrou a máxima atividade no pH 7,0, o que está de acordo com os resultados apresentados pela enzima original extraída do fruto verde da *Bromelia fastuosa*.

- A figura 6 mostra o gráfico do efeito da concentração da uréia sobre a atividade catalítica da Fast-rec, utilizando como substrato a caseína a 1 %. A enzima mostrou uma perda progressiva da atividade catalítica conforme aumentamos a concentração de uréia, o que ocorreu ao contrário da enzima Fastuosaina selvagem, onde ela suporta até 2M de uréia sem perder a atividade catalítica na presença do substrato caseína, como testado com a Fast-rec.

- A figura 7 mostra o efeito da concentração do NaCl sobre a atividade catalítica da Fast-rec, utilizando como substrato a caseína a 1%. Observamos a diminuição da atividade catalítica com o aumento da concentração do sal. Já com a enzima Fastuosaina selvagem a atividade catalítica aumenta utilizando o substrato sintético Abz-KLRFSKQ-EDDnp.

- A figura 8 mostra o efeito da estabilidade térmica sobre a atividade catalítica da Fast-rec, utilizando como substrato a caseína a 1 %. Observou-se que na temperatura de 25°C a Fast-rec perde a sua atividade catalítica levemente, mas com o aumento da temperatura para 37°C a perda de atividade se acentuou, o mesmo acontecendo com as temperaturas de 45 e 55°C.

- A figura 9 mostra a temperatura ótima da Fast-rec, utilizando como substrato a caseína a 1%. A temperatura ótima para a Fast-rec ficou por volta de 50°C, a mesma observada para a Fastuosaina selvagem.

Em revisão feita em sites de busca de patentes, não se encontrou nenhuma peptidase deste tipo, o que a torna original e nova no mercado, tendo um grande potencial de aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e de biotecnologia em aplicações de despoluição do meio ambiente e também em tipagem de grupos sanguíneos, tendo em vista o que foi observado para a Fastuosaina selvagem, com a vantagem de essa enzima poder ser produzida em maior escala devido à expressão em *E. coli* ou outros

organismos procariontes ou eucariontes, o que deve aumentar suas aplicações e usos.

Essa vantagem também pode ser esperada em relação às outras peptidases existentes no mercado, uma vez que, como se pôde observar nas revisões antes citadas, o potencial de aplicação das mesmas é bem inferior ao da Fastuosaina selvagem.

Essa invenção compreende o método de expressão da Fastuosaina recombinante sendo efetuado a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética para a forma nativa.

Vantajosamente a invenção refere-se ao método de expressão da Fastuosaina recombinante sendo efetuado em organismo a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética em fusão com outras proteínas e peptídeos.

Mais vantajosamente o método de expressão da Fastuosaina recombinante pode ser efetuado em organismo a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética em fusão com peptídeos.

Preferencialmente o método de expressão da Fastuosaina recombinante pode ser efetuado em organismo a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética em fusão com parte da proteína original.

Ainda mais vantajosamente o método de expressão comporta organismo compreendendo procarioto ou eucarioto.

Preferencialmente o método de expressão comporta procarioto compreendendo bactérias.

Mais preferencialmente o método de expressão comporta bactérias compreendendo *Escherichia coli*.

Preferencialmente o método de expressão de Fastuosaina em *E. coli*, pode ser efetuado a partir de cDNA subclonado no vetor pET23a.

Mais preferencialmente o vetor de DNA compreende as Seqs.ID NO: 1 e 2, relativas às figuras 2 e 3, citadas também na listagem de seqüências.

Ainda mais vantajosamente o vetor contendo o gene da Fastuosaina recombinante compreende a Seq. ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de seqüências.

Preferencialmente o organismo recombinante compreende a Seq. ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de seqüências.

5 Mais preferencialmente o organismo recombinante contém parte desta proteína.

Vantajosamente a seqüência de DNA pode fazer pareamento com a Seq. ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de seqüências.

10 Preferencialmente a seqüência de nucleotídeos pode codificar uma das seqüências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

Mais preferencialmente a proteína Fastuosaina de *Bromelia fastuosa* refere-se à seqüência relativa à figura 2.

15 Vantajosamente a proteína Fastuosaina de *Bromelia fastuosa* refere-se à seqüência relativa à figura 2 e qualquer das isoformas citadas.

Listagem de Seqüências

INFORMAÇÕES GERAIS DO PEDIDO DE PATENTES

(I) Dados dos Requerentes:

20

a) Nomes:

Hamilton Cabral

Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Andréia Machado Leopoldino

Eloísa Helena Tajara da Silva

25

b) Endereço:

R. Cristóvão Colombo, 2265 - Lab. de Bioquímica -
São José do Rio Preto - SP - CEP 15054-000

(III) Título da Invenção:

Clonagem molecular e expressão em *E. coli* da

30

Fastuosaina

(IV) Número de Seqüências Constantes do Pedido:

Duas

INFORMAÇÕES GERAIS DAS SEQÜÊNCIAS

(I) Números identificadores das seqüências

35

SEQ. ID NO:1

SEQ. ID NO:2

(II) Características gerais das seqüências:

SEQ. ID NO:1

a) Tamanho:

694 nucleotídeos

b) Tipo:

Gene

c) Conformação da fita:

R-L (5'-3')

SEQ. ID NO:2

a) Tamanho:

220 aminoácidos

b) Tipo:

Enzima ou Proteína

c) Conformação da fita:

Conformação primária: de N-terminal para C-terminal

(III) Características das moléculas seqüenciadas:

a) Tipo:

cDNA (SEQ. ID NO:1)

Enzima ou Proteína (SEQ. ID NO:2)

b) Nome do gene:

DNA recombinante (Fast-rec)

c) Produto do gene:

Fastuosaina recombinante (Fast-rec) (proteína recombinante)

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

- Fonte Original da Molécula

Fruto da *Bromelia fastuosa* (planta)

- Posição da Seqüência no Genoma

A planta não possui genoma seqüenciado

- Fenótipo Associado

Produção da enzima Fastuosaina recombinante

- Atividade Enzimática

Peptidase (hidrolisa ligações peptídicas)

- Atividade Biológica

Peptidase (hidrolisa ligações peptídicas)

- Função Geral da Classe do Produto do Gene

Hidrolisar ligações peptídicas

- Localização Celular

Vacúolo

DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (SEQ. ID NO:1)

5 ATACATATGGCTAGC GTGCCTCAAAGTATTGATTGGAGAGACTATGGTGGCCGTAACA 60
MetAlaSerAlaValProGlnSerIleAlaTrpArgAspTyrGlyAlaValThr 18

AGTGTCAAAAATCAAGGCAGCTGCGGTTCTTGCTGGGCATTTCAGTGCAATTGCGACGGTG 120
SerValLysAsnGlnGlySerCysGlySerCysTrpAlaPheSerAlaIleAlaThrVal 38

GAAGGAATCTACAAGATCAAAGCAGGTAACCTTAATATCTCTATCAGAGCAGGAAGTTCTC 180
10 GluGlyIleTyrLysIleLysAlaGlyAsnLeuIleSerLeuSerGluGlnGluValLeu 58

GATTGTGCTCTTAGCTACGGGTGCGATGGCGGCTGGGTGAACAAGGCCTATGATTTTCATC 240
AspCysAlaLeuSerTyrGlyCysAspGlyGlyTrpValAsnLysAlaTyrAspPheIle 78

ATATCTAACAATGGTGTGACGTCCTTTGCTAACTTACCATACAAAGGATACAAAGGCCCT 300
IleSerAsnAsnGlyValThrSerPheAlaAsnLeuProTyrLysGlyTyrLysGlyPro 98

15 TGCAACCACAATGACTTGCCCAATAAAGCTTACATTACTGGTTATACATATGTGCAAAGC 360
CysAsnHisAsnAspLeuProAsnLysAlaTyrIleThrGlyTyrThrTyrValGlnSer 118

AATAACGAACGCAGCATGATGATCGCGGTGGCGAATCAACCAATAGCTGCTCTTATCGAT 420
AsnAsnGluArgSerMetMetIleAlaValAlaAsnGlnProIleAlaAlaLeuIleAsp 138

GCCGGCGGAGACTTTCAATATTACAAAAGCGGTGTGTTTACTGGATCTTGTGGAAGTAGC 480
20 AspGlyGlyAspPheGlnTyrTyrLysSerGlyValPheThrGlySerCysGlyThrSer 158

CTCAATCATGCCATCACCGTTATAGGTTACGGGCAGACTAGTAGCGGAACAAAATATTGG 540
LeuAsnHisAlaIleThrValIleGlyTyrGlyGlnThrSerSerGlyThrLysTyrTrp 178

ATAGTAAAGAACTCATGGGGTACCTCATGGGGTGAGCGTGGATACATCCGTATGGCCAGA 600
IleValLysAsnSerTrpGlyThrSerTrpGlyGluArgGlyTyrIleArgMetAlaArg 198

25 GATGTGTCATCACCATATGGATTGTGTGGAATCGCCATGGCTCCCCTCTTTCCCCTCTG 660
AspValSerSerProTyrGlyLeuCysGlyIleAlaMetAlaProLeuPheProThrLeu 218

CAA TGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGAC 694
GlnSer 220

Legenda:

30

CODON DE INÍCIO

SÍTIO DE CLONAGEM DO VETOR

STOP CODON

SÍTIO DE CLONAGEM DO VETOR

SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS (SEQ. ID NO:2)

MetAlaSerAlaValProGlnSerIleAspTrpArgAspTyrGlyAla 16
 ValThrSerValLysAsnGlnGlySerCysGlySerCysTrpAlaPhe 32
 5 SerAlaIleAlaThrValGluGlyIleTyrLysIleLysAlaGlyAsn 48
 LeuIleSerLeuSerGluGlnGluValLeuAspCysAlaLeuSerTyr 64
 GlyCysAspGlyGlyTrpValAsnLysAlaTyrAspPheIleIleSer 80
 AsnAsnGlyValThrSerPheAlaAsnLeuProTyrLysGlyTyrLys 96
 GlyProCysAsnHisAsnAspLeuProAsnLysAlaTyrIleThrGly 112
 10 TyrThrTyrValGlnSerAsnAsnGluArgSerMetMetIleAlaVal 128
 AlaAsnGlnProIleAlaAlaLeuIleAspAspGlyGlyAspPheGln 144
 TyrTyrLysSerGlyValPheThrGlySerCysGlyThrSerLeuAsn 160
 HisAlaIleThrValIleGlyTyrGlyGlnThrSerSerGlyThrLys 176
 TyrTrpIleValLysAsnSerTrpGlyThrSerTrpGlyGluArgGly 192
 15 TyrIleArgMetAlaArgAspValSerSerProTyrGlyLeuCysGly 208
 IleAlaMetAlaProLeuPheProThrLeuGlnSer 220

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1. "ENZIMA OU PROTEÍNA", caracterizada por ser uma peptidase geneticamente modificada a partir da peptidase extraída do fruto da *Bromelia fastuosa*.

2. "ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender amino ácidos 1-220 de SEQ ID NO:2, relativa à figura 3, citada também na listagem de seqüências.

3. "ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser codificada pela inserção de cDNA de vetor pET23a em células de *E. coli* (BL21(DE3)pLys), células quimicamente competentes, de número de acesso ATCC 69382.

4. "ORGANISMO RECOMBINANTE" caracterizado por ser uma peptidase geneticamente modificada a partir da peptidase extraída do fruto da *Bromelia fastuosa*.

5. "ORGANISMO RECOMBINANTE", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender a Seq. ID NO:1 relativa à figura 2, citada também na listagem de seqüências.

6. "ORGANISMO RECOMBINANTE", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por conter parte da proteína Fastuosaina.

7. "SEQÜÊNCIA DE DNA ISOLADO", caracterizada por codificar uma das seqüências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

8. "SEQÜÊNCIA DE DNA ISOLADO", de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por codificar a seqüência de aminoácidos 1-220 de SEQ ID NO:2, relativa à figura 3, citada também na listagem de seqüências.

9. "SEQÜÊNCIA DE DNA ISOLADO", de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por compreender bases nucleotídicas 1-694 de SEQ ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de seqüências.

10. "SEQÜÊNCIA DE DNA ISOLADO", de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por poder fazer pareamento com a seq. ID. NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de seqüências.

11. **"VETOR DE EXPRESSÃO"**, caracterizado por compreender uma sequência de DNA capaz de codificar uma das sequências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

12. **"VETOR DE EXPRESSÃO"**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender uma sequência de DNA capaz de codificar a sequência de amino ácido 1-220 de SEQ ID NO:2, relativa à figura 3, citada também na listagem de sequências.

13. **"VETOR DE EXPRESSÃO"**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender uma sequência de DNA constituída de bases nucleotídicas 1-694 de SEQ ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de sequências.

14. **"VETOR DE EXPRESSÃO"**, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por compreender uma sequência de DNA capaz de poder fazer pareamento com a seq. ID. NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de sequências.

15. **"CÉLULA HOSPEDEIRA"**, caracterizada por ser transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar uma das sequências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

16. **"CÉLULA HOSPEDEIRA"**, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada por ser transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar a sequência de aminoácidos 1-220 de SEQ ID NO:2, relativa à figura 3, citada também na listagem de sequências.

17. **"CÉLULA HOSPEDEIRA"**, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada por ser transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA constituída de bases nucleotídicas 1-694 de SEQ ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de sequências.

18. **"CÉLULA HOSPEDEIRA"**, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada por ser transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de poder fazer pareamento com a seq. ID. NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de sequências.

19. "CÉLULA HOSPEDEIRA", de acordo com a reivindicação 15, caracterizada por poder compreender organismo procarioto ou eucarioto.

20. "CÉLULA HOSPEDEIRA", de acordo com a reivindicação 19, caracterizada por compreender bactérias.

21. "CÉLULA HOSPEDEIRA", de acordo com a reivindicação 20, caracterizada por compreender *Escherichia coli*.

22. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", caracterizado por ser efetuado a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética para a forma nativa.

23. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por ser efetuado em organismo a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética em fusão com outras proteínas e peptídeos.

24. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por poder ser efetuado em organismo a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética em fusão com peptídeos.

25. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por poder ser efetuado em organismo a partir de cDNA ou sequência genômica ou sequência sintética em fusão com parte da proteína original.

26. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por ser realizado com organismo procarionte ou eucarionte.

27. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por ser realizado com bactérias.

28. "MÉTODO DE EXPRESSÃO", de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por ser realizado com *Escherichia coli*.

29. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", caracterizado por compreender a cultura de uma célula hospedeira transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar uma das sequências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

30. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por

compreender a cultura de uma célula hospedeira transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar a sequência de amino ácido 1-220 de SEQ ID NO:2, relativa à figura 3, citada também na listagem de

5
31. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por compreender a cultura de uma célula hospedeira transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA constituída de bases nucleotídicas 1-694 de SEQ ID NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de sequências.

10
32. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por compreender a cultura de uma célula hospedeira transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de poder fazer pareamento com a seq. ID. NO:1, relativa à figura 2, citada também na listagem de sequências.

15
33. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por compreender a cultura de uma célula hospedeira que compreenda organismo procarioto ou eucarioto transfectado ou transformado com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar uma das sequências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

20
25
34. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por compreender a cultura de uma célula hospedeira que compreenda bactéria transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar uma das sequências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

30
35
35. "PROCESSO PARA PRODUZIR UMA ENZIMA OU PROTEÍNA", de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por compreender a cultura de uma célula hospedeira que compreenda *Escherichia coli* transfectada ou transformada com o vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA capaz de codificar uma das sequências de aminoácidos da Fastuosaina recombinante.

FIGURA 1

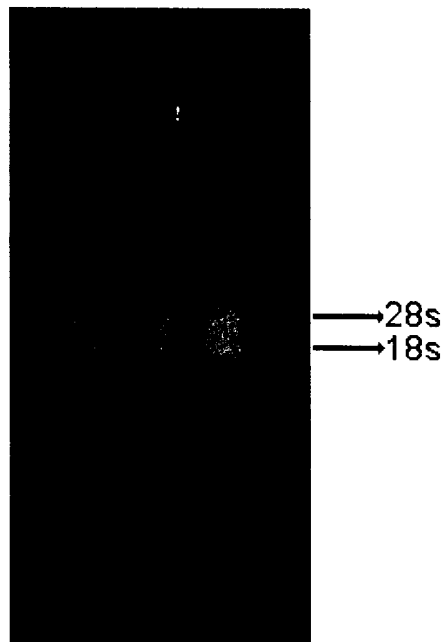


FIGURA 2

	1	10	20	30	40	50	60
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	GCAGTGCCCTCAAGTATTGATTGGAGAGACATGGTGCCGTAAACAAGTGTG						
Consensus	ATGGCTAGCGCAGTGCCCTCAAGTATTGATTGGAGAGACATGGTGCCGTAAACAAGTGTG						
	61	70	80	90	100	110	120
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	AAAAATCAGGCGAGCTGGGGTCTTTGCTGGGCAATTCAGTGCATTTGGGACGGTGGAGGGA						
Consensus	AAAAATCAGGCGAGCTGGGGTCTTTGCTGGGCAATTCAGTGCATTTGGGACGGTGGAGGGA						
	121	130	140	150	160	170	180
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	ATCTACAGATCAGAGCAGGTAACTTAATACTCTATCAGAGCAGGAGTCTCTGATTTG						
Consensus	ATCTACAGATCAGAGCAGGTAACTTAATACTCTATCAGAGCAGGAGTCTCTGATTTG						
	181	190	200	210	220	230	240
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	GCTCTTAGCTACGGGTGCGATGGCGGCTGGGTGACACAGGCCATGATTTTCATCATATCT						
Consensus	GCTCTTAGCTACGGGTGCGATGGCGGCTGGGTGACACAGGCCATGATTTTCATCATATCT						
	241	250	260	270	280	290	300
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	AACAAATGGTGTGAGCTCCTTTGCTAACTTACCATACAAAGGATACAAAGGCCCTTGCAAC						
Consensus	AACAAATGGTGTGAGCTCCTTTGCTAACTTACCATACAAAGGATACAAAGGCCCTTGCAAC						
	301	310	320	330	340	350	360
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	CACAAATGACTTGGCCCAATAAAGCTTAATTTCTGGTTATACATATGTGCAAAACATAAAC						
Consensus	CACAAATGACTTGGCCCAATAAAGCTTAATTTCTGGTTATACATATGTGCAAAACATAAAC						
	361	370	380	390	400	410	420
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	GAACGCGAGCATGATGATCGCGGTGGCGAATCAACCAATAGCTGCTCTTATCGATGCCGGC						
Consensus	GAACGCGAGCATGATGATCGCGGTGGCGAATCAACCAATAGCTGCTCTTATCGATGCCGGC						
	421	430	440	450	460	470	480
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	GGAGACTTTCAATATTACAAAGCGGTGTGTTTACTGGATCTTGTGGAACTAGCCTCAAT						
Consensus	GGAGACTTTCAATATTACAAAGCGGTGTGTTTACTGGATCTTGTGGAACTAGCCTCAAT						
	481	490	500	510	520	530	540
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	CATGCCATCACCCTTATAGGTTACGGGCGAGCTAGTAGCGGAACAAATATTGGATAGTA						
Consensus	CATGCCATCACCCTTATAGGTTACGGGCGAGCTAGTAGCGGAACAAATATTGGATAGTA						
	541	550	560	570	580	590	600
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	AAGAACTCTATGGGTACCTCATG6GGTGGGCTGGATACATCCGTATGGCCAGAGATGTG						
Consensus	AAGAACTCTATGGGTACCTCATG6GGTGGGCTGGATACATCCGTATGGCCAGAGATGTG						
	601	610	620	630	640	650	660
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	TCATCAACCATATGGATTGTGTGGAAATGCGCAATGGCTCCCTCTTTCCCACTCTGCAATCG						
Consensus	TCATCAACCATATGGATTGTGTGGAAATGCGCAATGGCTCCCTCTTTCCCACTCTGCAATCG						

FIGURA 3

	1	10	20	30	40	50	60
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	NYPQSIDWRDYGAVTSVKNQGSCGSCNAFSAIATVEGIYKIKAGNLISLSEQEVLDC						
Consensus	...NYPQSIDWRDYGAVTSVKNQGSCGSCNAFSAIATVEGIYKIKAGNLISLSEQEVLDC						
	61	70	80	90	100	110	120
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	ALSYGCDGGHVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHNDLPNKAYITGYTYVQSNN						
Consensus	ALSYGCDGGHVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHNDLPNKAYITGYTYVQSNN						
	121	130	140	150	160	170	180
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	ERSMHIAYANQPIAALIDAGGDIQYYKSGVITGSCGTSLNHAITVIGYGQTSSGTYKYLIV						
Consensus	ERSMHIAYANQPIAALIDAGGDIQYYKSGVITGSCGTSLNHAITVIGYGQTSSGTYKYLIV						
	181	190	200	210	220		
fastuosainaselvagen	-----+-----+-----+-----+-----						
fastuosainarecombina	KNSHGTSHGERGYIRMARDYSSPYGLCGIAHAPLEPTLQS						
Consensus	KNSHGTSHGERGYIRMARDYSSPYGLCGIAHAPLEPTLQS						

FIGURA 4

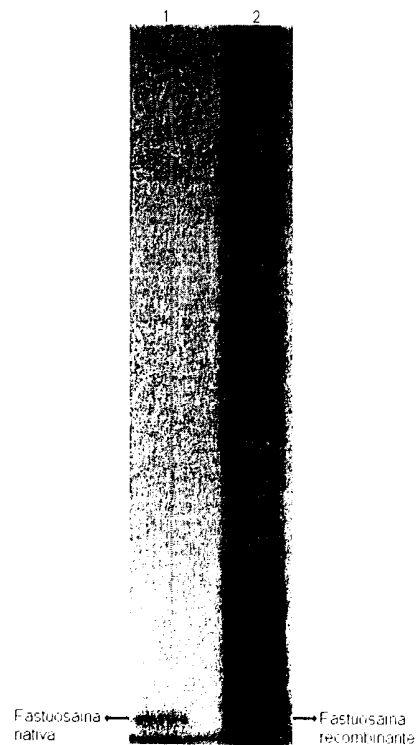


FIGURA 5

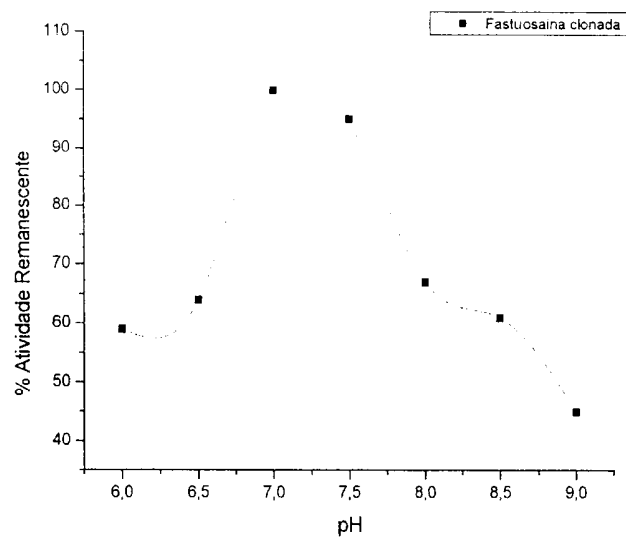


FIGURA 6

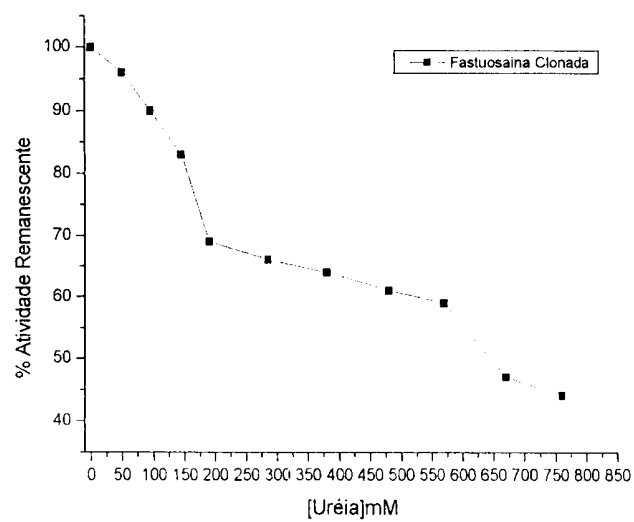


FIGURA 7

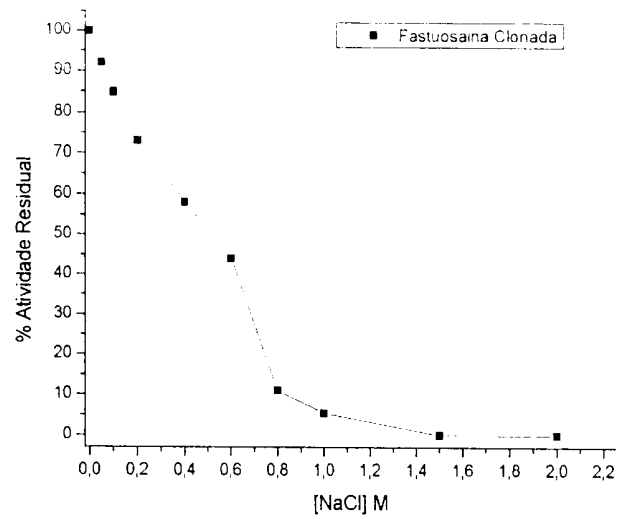


FIGURA 8

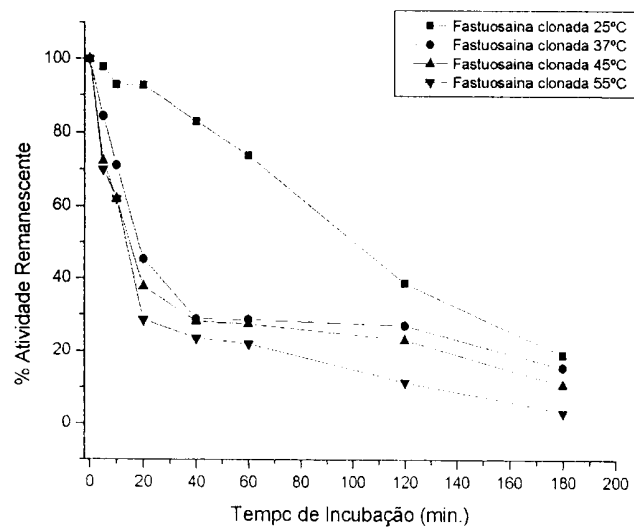
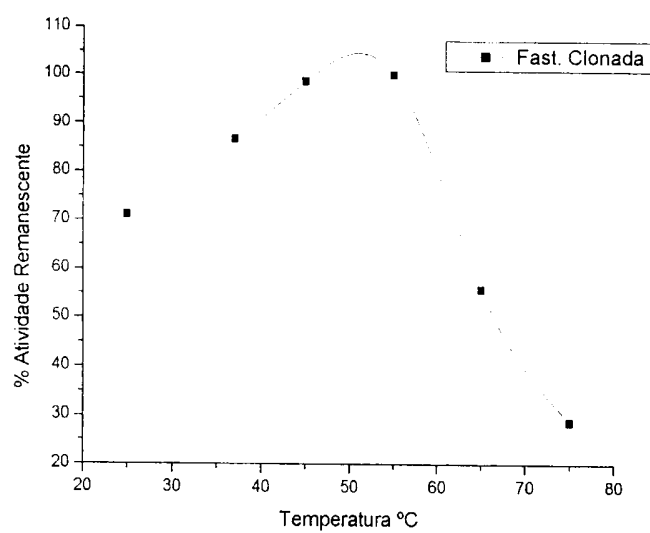


FIGURA 9



R E S U M O

**"CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO EM E. COLI DA
FASTUOSAINA"**

5 A presente invenção refere-se à clonagem e
expressão da peptidase Fastuosaina, encontrada na natureza no
fruto da *Bromelia fastuosa*, pela bactéria *E. coli*, podendo ser
expressa por outros organismos procariontes ou eucariontes.