



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 903**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/80 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04751203 .3**
96 Fecha de presentación : **30.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1625219**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Métodos para producir polipéptidos segregados.**

30 Prioridad: **02.05.2003 US 467766 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.01.2011

73 Titular/es: **NOVOZYMES Inc.**
1445 Drew Avenue
Davis, California 95616, US

72 Inventor/es: **Fidantsef, Ana;**
Brody, Howard y
Maiyuran, Suchindra

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 350 903 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 350 903 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos para producir polipéptidos segregados.

5 **Escrito en cuanto a Derechos para Inveniones Hechas Bajo Investigación y Desarrollo Patrocinados Federalmente**

10 Esta invención se hizo con el apoyo del Gobierno bajo el subcontrato NREL n°. ZCO-30017-02, Contrato Preferente DE-AC36-98GO10337 otorgado por el Departamento de Energía. El gobierno tiene derechos determinados sobre esta invención.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a métodos para producir polipéptidos segregados.

Descripción de las técnicas relacionadas

20 La producción recombinante de una proteína heteróloga en una célula huésped fúngica, particularmente una célula micótica filamentosa tal como *Aspergillus* o una célula de levadura tal *Saccharomyces*, puede proporcionar un vehículo más deseable para producir la proteína en cantidades comercialmente pertinentes.

25 La producción recombinante de una proteína heteróloga se realiza generalmente construyendo un cassette de expresión en el cual la codificación de ADN para la proteína se coloca bajo el control de la expresión de un promotor, extirpado de un gen regulado, adecuado para la célula huésped. El cassette de expresión se introduce en la célula huésped, normalmente por transformación mediada por plásmidos. La producción de la proteína heteróloga se consigue entonces por cultivo de la célula huésped transformada bajo condiciones inductoras necesarias para el funcionamiento apropiado del promotor contenido en el cassette de expresión.

30 La mejora de la producción recombinante de proteínas requiere generalmente la disponibilidad de secuencias reguladoras nuevas las cuales son adecuadas controlando la expresión de las proteínas en una célula huésped.

35 La patente estadounidense, N°. 6.015.703 expone constructos genéticos comprendiendo un promotor, una señal de secreción de xilanasas, y una región de codificación de beta-glucosidasa madura. Los constructos descritos, expresados en microbios recombinantes, aumentan espectacularmente la cantidad de beta-glucosidasa producida en relación a los microbios no transformados.

40 WO 91/17243 expone una endoglucanasa V y su gen a partir de *Humicola insolens* DSM 1800.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos mejorados para producir un polipéptido en una célula huésped fúngica usando secuencias de péptido señal.

Resumen de la invención

45 La presente invención se refiere a métodos para producir un polipéptido segregado, comprendiendo:

50 (a) cultivar una célula huésped fúngica en un medio propicio para la producción del polipéptido, donde la célula huésped fúngica comprende un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una primera secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal operativamente enlazado a una segunda secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido, donde la primera secuencia de nucleótidos es ajena a la segunda secuencia de nucleótidos, el extremo 3' de la primera secuencia de nucleótidos está situado inmediatamente corriente arriba del codón iniciador de la segunda secuencia de nucleótidos, y la primera secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

55 (i) una secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37;

60 (ii) una secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal comprendiendo una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 90% de identidad con la SEC ID n°: 37, y codificando una variante del péptido señal teniendo una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No: 37 comprendiendo una sustitución o delección de uno o más aminoácidos que no afectan significativamente a la actividad del péptido señal; y

65 (b) aislar el polipéptido segregado del medio de cultivo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra un mapa de restricción de pAlLo1.

5 Figura 2 muestra un mapa de restricción de pMJ04.

Figura 3 muestra un mapa de restricción de pCaHj527.

10 Figura 4 muestra un mapa de restricción de pMT2188.

Figura 5 muestra un mapa de restricción de pCaHj568.

Figura 6 muestra un mapa de restricción de pMJ05.

15 Figura 7 muestra un mapa de restricción de pSMai130.

Figura 8 muestra la secuencia de ADN (SEC ID n°: 34) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n°: 35) de la secuencia señal de secreción de una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

20 Figura 9 muestra la secuencia de ADN (SEC ID n°: 36) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n°: 37) de la secuencia señal de secreción de una endoglucanasa V de *Humicola insolens*.

Figura 10 muestra un mapa de restricción de pSMai135.

25 Figura 11 muestra un mapa de restricción de pSAtE101.

Figura 12 muestra un mapa de restricción de pSAtE111.

30 Figura 13 muestra un mapa de restricción de pALFd1.

Figura 14 muestra un mapa de restricción de pAlLo2.

Figura 15 muestra un mapa de restricción de pEJG97.

35 Figura 16 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID Nos: 46 y 47, respectivamente). El péptido señal anteriormente citado está subrayado y los intrones anteriormente citados están en letra itálica.

40 Figura 17 muestra un mapa de restricción de pCR4Blunt-TOPOAfcDNA5'.

Figura 18 muestra un mapa de restricción de pCR4Blunt-TOPOAfcDNA3'.

Figura 19 muestra un mapa de restricción de pCR4Blunt-TOPOAfcDNA.

45 Figura 20 muestra un mapa de restricción de pALFd7.

Figura 21 muestra un mapa de restricción de pALFd6.

50 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir un polipéptido, comprendiendo: (a) cultivar una célula huésped fúngica en un medio propicio para la producción del polipéptido, donde la célula huésped fúngica comprende un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una primera secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal operativamente enlazado a una segunda secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido, donde la primera secuencia de nucleótidos es ajena a la segunda secuencia de nucleótidos y el extremo 3' de la primera secuencia de nucleótidos está situada inmediatamente corriente arriba del codón iniciador de la segunda secuencia de nucleótidos, donde la primera secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: (i) una secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37 y (ii) una secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal comprendiendo una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 90% de identidad con la SEC ID n°: 37, y codificando una variante del péptido señal con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No: 37 comprendiendo una sustitución o delección de uno o más aminoácidos que no afectan significativamente a la actividad del péptido señal; y (b) aislar el polipéptido segregado del medio de cultivo.

65 En los métodos de producción de la presente invención, las células huésped fúngicas se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a gran escala o a pequeña escala (incluyendo las fermentaciones continua, en lote, en flujo discontinuo, o en estado sólido) en laboratorio o en fermentadores industriales

ES 2 350 903 T3

realizado en un medio adecuado y bajo condiciones permitiendo al polipéptido expresarse y/o aislarse. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection).

Los polipéptidos se pueden detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, o la desaparición de un sustrato enzimático.

En los métodos de la presente invención, la célula fúngica produce preferiblemente al menos aproximadamente un 25% más, más preferiblemente al menos aproximadamente un 50% más, más preferiblemente al menos aproximadamente un 75% más, más preferiblemente al menos aproximadamente un 100% más, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 200% más, de la forma más preferible al menos aproximadamente un 300% más, e incluso de la forma más preferible al menos aproximadamente un 400% más de polipéptidos en relación a una célula fúngica conteniendo una secuencia de péptido señal nativa operativamente enlazada a una secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido cuando se cultiva bajo condiciones de producción idénticas.

El polipéptido segregado resultante se puede recuperar directamente del medio por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitándose a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

Los polipéptidos se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Secuencias de péptido señal

El término “secuencia de péptido señal” se define aquí como una región de codificación peptídica que codifica una secuencia de aminoácidos vinculada al amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado dentro de la vía secretora de la célula.

El término “operativamente enlazado” se define aquí como una configuración en la cual una secuencia de control, por ejemplo, una secuencia de péptido señal, está apropiadamente colocada en una posición en relación a una secuencia codificante de manera que la secuencia de control dirige la producción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante.

El término “secuencia codificadora” se define aquí como una secuencia de nucleótidos que está transcrita en ARNm la cual se traduce en un polipéptido colocado bajo el control de las secuencias de control apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por el codón de iniciación localizado en el comienzo del marco de lectura abierto del extremo 5' del ARNm y un codón de detención localizado en el extremo 3' del marco de lectura abierto del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, secuencias de nucleótidos de ADN genómico, de ADNc, semisintéticas, sintéticas, y recombinantes.

El extremo 5' de la secuencia codificante polipeptídica puede contener una región de codificación de péptido señal nativa naturalmente vinculada en marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido, donde la región de codificación de péptido señal de la presente invención puede simplemente reemplazar la región de codificación de péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Alternativamente, en el extremo 5' de la secuencia codificante polipeptídica puede faltar una región de codificación de péptido señal nativa.

En los métodos de la presente invención, la secuencia de péptido señal es ajena a la secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido de interés, pero la secuencia de péptido señal o secuencia de nucleótidos puede ser nativa a la célula huésped fúngica.

En un aspecto, las secuencias de nucleótido aisladas codificando un péptido señal tienen un grado de identidad con la SEC ID n°: 37 de al menos un 90%, de la forma más preferible al menos aproximadamente un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos aproximadamente un 97%, las cuales tienen la capacidad de dirigir un polipéptido dentro de una vía secretora de la célula (de ahora en adelante “péptidos señal homólogos”). En un aspecto preferido, los péptidos señal homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere por cinco aminoácidos, preferiblemente por cuatro aminoácidos, más preferiblemente por tres aminoácidos, incluso más preferiblemente por dos aminoácidos, y de la forma más preferible por un aminoácido de la SEC ID n°: 37. Para objetivos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiples: Penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Parámetros de alineación por pares son Ktuple=1, gap penalty=3, windows=5, y diagonals=5.

ES 2 350 903 T3

Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos codifican péptidos señal que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37, o variantes alélicas de la misma; o fragmentos de la misma que tienen la capacidad de dirigir el polipéptido dentro de una vía secretora de la célula. En un aspecto más preferido, una secuencia de nucleótidos de la presente invención codifica una señal peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos codifica un péptido señal que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37, o un fragmento de la misma, donde el fragmento de péptido señal tiene la capacidad de dirigir un polipéptido dentro de una vía secretora de la célula. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos de la presente invención codifica un péptido señal que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37.

La presente invención también comprende secuencias de nucleótidos que codifican un péptido señal teniendo la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37, la cual difiere de la SEC ID n°: 36 en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de la SEC ID n°: 36 las cuales codifican fragmentos de la SEC ID n°: 37 las cuales tienen la capacidad de dirigir un polipéptido dentro de una vía secretora de la célula.

Una subsecuencia de la SEC ID n°: 36 es una secuencia de ácidos nucleicos comprendida por la SEC ID n°: 36 excepto porque uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' se han delecionado. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 45 nucleótidos, más preferiblemente al menos 51 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 57 nucleótidos. Un fragmento de la SEC ID n°: 37 es un polipéptido teniendo uno o más aminoácidos delecionados del amino y/o carboxi terminal de esta secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 15 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 17 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 19 residuos de aminoácidos.

Una variante alélica denota cualquiera de dos o formas alternativas de un gen ocupando la misma localización cromosómica. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en un polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (ningún cambio en el péptido señal codificado) o pueden codificar péptidos señal teniendo secuencias de aminoácidos alteradas. La variante alélica de un péptido señal es un péptido codificado por una variante alélica de un gen.

En un aspecto preferido, la primera secuencia de nucleótidos es la secuencia codificante de péptido señal del gen de endoglucanasa V contenida en *Humicola insolens* DSM 1800.

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID n°: 36 o una subsecuencia de la misma, al igual que la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37 o un fragmento de la misma, se puede utilizar para diseñar una sonda de ácido nucleico a identificar y para clonar péptidos señal de codificación de ADN a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADNc o genómico del género o especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándares, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en este caso. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 15, preferiblemente de al menos 25, y más preferiblemente de al menos 35 nucleótidos de longitud. Se pueden usar ambas sondas de ADN y ARN. Las sondas normalmente se marcan para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina). Tales sondas están comprendidas por la presente invención.

Así, un ADN genómico o genoteca de ADNc obtenida a partir de tales otros organismos se pueden examinar para obtener ADN que hibridice con las sondas anteriormente descritas y que codifique un péptido señal. El genómico u otro ADN de tales otros organismos se pueden separar mediante agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Con el fin de identificar un clon o ADN que sea homólogo a la SEC ID n°: 36 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern. Para objetivos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de ácido nucleico hibridiza a una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID n°: 36, su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma, bajo las condiciones de astringencia definidas aquí. Las moléculas a las cuales la sonda de ácido nucleico hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando una película radiográfica.

En un aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de la SEC ID n°: 37, o una subsecuencia de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la SEC ID n°: 36. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante de péptido señal del gen de endoglucanasa V contenida en *Humicola insolens* DSM 1800.

En otro aspecto, las secuencias de ácido nucleico aisladas codifican variantes del péptido señal teniendo una secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37 comprendiendo una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más aminoácidos.

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal variantes pueden diferir de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37 por una inserción o delección de uno o más residuos de aminoácidos y/o la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos diferentes. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, tal como las sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente a la actividad del péptido señal; o delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 5 aminoácidos.

ES 2 350 903 T3

Ejemplos de sustituciones conservadoras los encontramos en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina y histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los cambios que ocurren más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly así como estos a la inversa.

La presente invención también se refiere a las secuencias de péptido señal aisladas descritas arriba.

Secuencias de nucleótidos de codificación de polipéptidos

El polipéptido codificado por la segunda secuencia de nucleótidos puede ser heterólogo o nativo a la célula huésped fúngica de interés.

El término “polipéptido” no se refiere aquí a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, comprende péptidos, oligopéptidos, y proteínas. El término “polipéptido heterólogo” se define aquí como un polipéptido que no es nativo a la célula fúngica, un polipéptido nativo en el cual se han hecho modificaciones para alterar la secuencia nativa, o un polipéptido nativo cuya expresión se altera de forma cuantitativa como resultado de una manipulación del gen que codifica el polipéptido por técnicas de ADN recombinantes. La célula fúngica puede contener una o más copias de la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido.

Preferiblemente, el polipéptido es una hormona o variante de la misma, una enzima, un receptor o parte del mismo, un anticuerpo o parte del mismo, o un indicador. En un aspecto preferido, el polipéptido es una oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, o ligasa. En un aspecto más preferido, el polipéptido es una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, celobiohidrolasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxiribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, alfa-galactosidasa, galactosidasa de beta, glucoamilasa, glucosidasa alfa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, xilanasas, o beta-xilosidasa. En un aspecto más preferido, el polipéptido es una endoglucanasa, celobiohidrolasa, y/o beta-glucosidasa útil en la conversión de celulosa a glucosa incluyendo, pero no limitándose a, la endoglucanasa I, endoglucanasa II, endoglucanasa III, endoglucanasa IV, endoglucanasa V, celobiohidrolasa I, celobiohidrolasa II, y beta-glucosidasa. Las enzimas de endoglucanasa y celobiohidrolasa se refieren colectivamente como “celulasas”.

La secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido de interés se puede obtener a partir de cualquier procarionta, eucariota, u otra fuente. Para objetivos de la presente invención, el término “obtenido a partir de” como se utilizan en este caso en relación a una fuente dada debe significar que el polipéptido se produce mediante la fuente o mediante una célula en la cual se ha insertado un gen de la fuente.

Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido de interés se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de la secuencia de nucleótidos a partir de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, Nueva York. Los procedimientos de clonación pueden implicar la escisión y el aislamiento de un fragmento de nucleótido deseado comprendiendo la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula de vector, y la incorporación del vector recombinante en la célula fúngica mutante donde se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o de cualquier combinación de los mismos.

En los métodos de la presente invención, el polipéptido también puede incluir un polipéptido híbrido o fundido en el cual otro polipéptido se funde en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por fundición de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codificando un polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codificando otro polipéptido. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen, ligar las secuencias de codificación codificando los polipéptidos de modo que éstas estén estructuradas y la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor(es) y terminador. El polipéptido híbrido puede comprender una combinación de secuencias polipéptidas completas o parciales obtenidas de al menos dos polipéptidos diferentes donde uno o más pueden ser heterólogas a la célula mutante fúngica.

Constructos de ácido nucleico

Se describen aquí constructos de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido operativamente enlazado a una secuencia de péptido señal de la presente invención y una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones

ES 2 350 903 T3

compatibles con las secuencias de control. La expresión se entenderá por incluir cualquier fase implicada en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitándose a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

5 “Constructo de ácidos nucleicos” se define aquí como una molécula de nucleótido, o bien de cadena única o doble, la cual está aislada de un gen de origen natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos combinados y superpuestos de tal manera que de no ser así no existirían en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término cassette de expresión cuando el constructo ácido nucleico contiene una secuencia codificante y todas las secuencias de control requeridas para la expresión de la secuencia codificante.

10 Una secuencia de nucleótidos aislada codificando un polipéptido puede manipularse en mayor medida de diferentes maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de nucleótidos antes de su inserción en un vector puede ser necesaria o deseable dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos utilizando métodos de ADN recombinantes se conocen bien en la técnica.

15 En los métodos de la presente invención, la secuencia de nucleótidos puede comprender una o más secuencias de control nativas o una o más de las secuencias de control nativas se pueden sustituir por una o más secuencias de control ajenas a la secuencia de nucleótidos para mejorar la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped.

20 El término “secuencias de control” se define aquí por incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de interés. Cada secuencia de control puede ser ajena o nativa a la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, secuencia de péptido señal de la presente invención, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen una secuencia de péptido señal de la presente invención, y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces con la intención de introducir sitios de restricción específicos facilitando la ligación de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido.

30 La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, la cual es reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de nucleótidos. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados, e híbridos, y se pueden obtener a partir de genes codificando polipéptidos intracelulares o extracelulares o bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

35 Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable ácida de *Aspergillus Niger*, glucoamilasa de *Aspergillus Niger* o de *Aspergillus awamori* (glaA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, isomerasa de triosa fosfato de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para la alfa-amilasa neutral de *Aspergillus Niger* y la isomerasa de triosa fosfato de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

50 En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO- 1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1,ADH2/GAP), isomerasa de triosa fosfato de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotionina de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huéspedes de levadura están descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

55 La secuencia de control puede ser una secuencia del terminador de transcripción adecuada, la cual es reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está operativamente enlazada al término 3' de la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

60 Los terminadores preferidos para células huéspedes fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

65 Terminadores preferidos para células huéspedes de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y dehidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huéspedes de levadura están descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

ES 2 350 903 T3

La secuencia de control también puede ser una secuencia guía adecuada, una región no traducida de un ARNm importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia guía está operativamente enlazada al término 5' de la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido. Cualquier secuencia guía que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

Líderes preferidos para células huéspedes fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* e isomerasa de triosa fosfato de *Aspergillus nidulans*.

Líderes adecuados para células huéspedes de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), fosfoglicerato-cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol dehidrogenasa/dehidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, la cual está operativamente enlazada al término 3' de la secuencia de nucleótidos y la cual, estando transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

Secuencias de poliadenilación preferidas para células huéspedes fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

Secuencias de poliadenilación útiles para células huéspedes de levadura están descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

La secuencia de control también puede ser una región de codificación de propéptido que codifique una secuencia de aminoácidos situada en el amino término de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir a un polipéptido maduro activo por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La región de codificación del propéptido se puede obtener de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

Donde están presentes tanto el péptido señal como regiones de propéptido en el amino terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino término de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al amino término de la región del propéptido.

También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen a excitar o evitar en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. En levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se pueden utilizar el promotor de alfa-amilasa TAKA, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten una amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa el cual se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína los cuales se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

Se describen aquí vectores de expresión recombinantes comprendiendo una secuencia de péptido señal de la presente invención, una secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido de interés, y señales de parada traducionales y transcripcionales. Las diferentes secuencias de nucleótidos y de control anteriormente descritas se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante el cual pueda incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del promotor y/o la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia de péptido señal y/o la secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de tal manera que la secuencia codificante está operativamente enlazada a una secuencia de péptido señal de la presente invención y una o más secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinantes y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente la compatibilidad del vector con la célula huésped en la cual se va a introducir el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

Los vectores contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen el producto del cual proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Marcadores adecuados para células huéspedes

ES 2 350 903 T3

des de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LiS2, MET3, TRP1, y URA3. Marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, amdS (acetamidasa), argB (ornitina-carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), hygB (higromicina fosfo-
5 transferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-d Descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa), trpC (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Son preferido para el uso en una célula de *Aspergillus* los genes amdS y pirG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen bar de *Streptomyces higroscopicus*.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extra-
10 cromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y se replicado junto con el/los cromosoma(s) en el/los cual(es) se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos los cuales juntos contengan el ADN total a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

15 Los vectores contienen preferiblemente un elemento(s) que permite la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de nucleótidos
20 codificando el polipéptido o de cualquier otro elemento del vector para la integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de nucleótidos adicionales permiten que el vector se integre en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferible un número suficiente de nucleótidos, tal como de 100 a 1.500 par de bases, preferiblemente de 400 a 1.500 par de bases, y de la forma más preferible de 800 a 1.500 par de bases, que sean altamente homólogos a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no co-
30 dificantes o codificantes. En cambio, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo que el
35 vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido mediando la replicación autónoma que funcione en una célula. El término "replicador plásmido" u "origen de replicación" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que habilita a un plásmido o vector para replicarse *in vivo*.

Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación
40 de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser uno teniendo una mutación que hace su funcionamiento termosensible en la célula huésped (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula micótica filamentosa son AMA1 y ANSI (Gems *et al.*,
45 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores comprendiendo el gen se pueden realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

Más de una copia de una secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido se puede insertar en la célula huésped
50 para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de nucleótidos se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de nucleótidos donde células conteniendo copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por tanto copias adicionales de la secuencia de nucleótidos, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

55 Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

60 Células huéspedes

Se describen aquí células huésped recombinantes, comprendiendo una secuencia de péptido señal de la presente
65 invención operativamente enlazada a una secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido, la cual se usa ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector comprendiendo una secuencia de péptido señal de la presente invención operativamente enlazado a una secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal autorreplicante como se describe anteriormente. El término "célula huésped" comprende

ES 2 350 903 T3

cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped depende en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

La célula huésped puede ser cualquier célula fúngica útil en los métodos de la presente invención. “Fungi” como se utiliza en este caso incluye la fila Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como se define por Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth y el Bisby’s Dictionary of The Fungi, 8a edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que la Oomycota (como se cita en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

En un aspecto preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. “Levadura” como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidiosporógena, y levadura perteneciente a los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Puesto que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los objetivos de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

En otro aspecto preferido, la célula huésped fúngica es una célula micótica filamentosa. “Hongos (Fungi) filamentosos” incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un tallo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de una especie de, pero no limitándose a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, o *Trichoderma*.

En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus Niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto incluso más preferido, el huésped fúngico filamentoso célula es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

En un aspecto más preferido, la célula de *Fusarium venenatum* es *Fusarium venenatum* A3/5, la cual fue depositada originalmente como *Fusarium graminearum* ATCC 20334 y recientemente reclasificada como *Fusarium venenatum* por Yoder y Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80 y O’Donnell *et al.*, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67; al igual que equivalentes taxonómicos de *Fusarium venenatum* a pesar del nombre de especie por el cual estos se conocen habitualmente. En otro aspecto preferido, la célula de *Fusarium venenatum* es un mutante morfológico de *Fusarium venenatum* A3/5 o ATCC de *Fusarium venenatum* 20334, como se describe en WO 97/26330.

En otro aspecto más preferido, la célula de *Trichoderma* es *Trichoderma reesei* ATCC 56765, *Trichoderma reesei* ATCC 13631, *Trichoderma reesei* CBS 526.94, *Trichoderma reesei* CBS 529.94, *Trichoderma longibrachiatum* CBS 528.94, *Trichoderma longibrachiatum* ATCC 2106, *Trichoderma longibrachiatum* CBS 592.94, *Trichoderma viride* NRRL 3652, *Trichoderma viride* CBS 517.94, y *Trichoderma viride* NIBH FERM/BP 447.

Las células micóticas se pueden transformar mediante un proceso implicando la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* se describen en EP 238 023 y por Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes de *Trichoderma reesei* se describen en Penttila *et al.*, 1987, Gene 61: 155-164, and Gruber *et al.*, 1990, Curr Genet. 18(1):71-6. Métodos adecuados para transformar la especie *Fusarium* se describen por Malardier *et al.*, 1989 Gene 78: 147-156 and WO 96/00787. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; and Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

ES 2 350 903 T3

Ejemplos

Cepas

5 *Trichoderma reesei* RutC30 (ATCC 56765 Montenecourt y Eveleigh, 1979, Adv. Chem. Ser. 181: de 289-301) fue derivada de *Trichoderma reesei* Qm6A (ATCC 13631 Mandels y Reese, 1957, J. Bacteriol. 73: 269-278). *Trichoderma reesei* RutC30 y *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 (MAT α , ura3-52, let-2 Δ 2, pep4 Δ 1; his4-539) (WO97/07205) se usaron como huéspedes para la expresión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Se usó *Aspergillus fumigatus* PaHa34 como la fuente de la Familia GH3A de beta-glucosidasa.

10

Medios y soluciones de tampón

15 El medio YP estuvo compuesto por litro de 10 g de extracto de levadura y 20 g de bactopectona.

15

El medio de selección de levadura estuvo compuesto por litro de 6,7 g de base nitrogenada de levadura; 0,8 g de mezcla de suplemento completa (CSM, Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA; carente de uracilo y conteniendo 40 mg/ml de adenina), 5 g de ácidos de casamino (sin aminoácidos), 100 ml de 0,5 M de succinato a pH 5.0, 40 ml de un 50% de glucosa, 1 ml de 100 mM de CuSO₄, 50 mg de ampicilina, y 25 mg de cloranfenicol.

20

El medio de placa de selección de levadura estaba compuesto por litro de medio de selección de levadura suplementado con 20 g de bacto agar y 150 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucopiranosida (X-Glc, INALCO SPA, Milán, Italia) pero carente de ampicilina y cloranfenicol.

25

Las placas de selección COVE estaban compuestas por litro de 342,3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM de acetamida, 15 mM de CsCl₂, y 25 g de agar Noble.

Las placas COVE2 estaban compuestas por litro de 30 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM de acetamida, y 25 g de agar Noble.

30

La solución salina COVE estaba compuesta por litro de 26 g de KCl, 26 g de MgSO₄·7H₂O, 76 g de KH₂PO₄, y 50 ml de metales traza COVE.

35

La solución de metales traza COVE estaba compuesta por litro de 0,04 g de NaB₄O₇·10H₂O, 0,4 g de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g de FeSO₄·7H₂O, 0,7 g de MnSO₄·H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₄·2H₂O, y 10 g de ZnSO₄·7H₂O.

40

Los medios de inducción de celulosa estaban compuestos por litro de 20 g de fibras celulósicas naturales Arbocel B800 (J. Rettenmaier USA LP, Schoolcraft, Michigan), 10 g de sólidos de maíz solubles (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1,45 g de (NH₄)₂SO₄, 2,08 g de KH₂PO₄, 0,28 g de CaCl₂, 0,42 g de MgSO₄·7H₂O, 0,42 ml de metales traza de *Trichoderma reesei*, y 2 gotas de ácido plurónico; a pH 6,0 con 10 N de NaOH.

La solución de metales traza de *Trichoderma reesei* estaba compuesta por litro de 216 g de FeCl₃·6H₂O, 58 g de ZnSO₄·7H₂O, 27 g de MnSO₄·H₂O, 10 g de CuSO₄·5H₂O, 2,4 g de H₃BO₃, y 336 g de ácido cítrico.

45

El tampón PEG estaba compuesto por litro de 500 g de clavija 4000 (BDH, Poole, Inglaterra), 10 mM de CaCl₂, y 10 mM de Tris-HCl a pH 7.5 (filtro esterilizado).

El STC estaba compuesto por litro de 1 M de sorbitol, 10 mM de CaCl₂, y 10 mM de Tris-HCl a pH 7.5 (filtro esterilizado).

50

El medio inóculo estaba compuesto por litro de 20 g de glucosa, 10 g de sólidos de maíz solubles (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1,45 g de (NH₄)₂SO₄, 2,08 g de KH₂PO₄, 0,28 g de CaCl₂, 0,42 g de MgSO₄·7H₂O, 0,42 ml de solución de metales traza de *Trichoderma reesei*, y 2 gotas de ácido plurónico; a pH final 5.0.

55

El medio de fermentación estaba compuesto por litro de 4 g de glucosa, 10 g de sólidos de maíz solubles, 30 g de fibras celulósicas naturales Arbocel B800 (J. Rettenmaier USA LP, Schoolcraft, Michigan), 3,8 g de (NH₄)₂SO₄, 2,8 g de KH₂PO₄, 2,08 g de CaCl₂, 1,63 g de MgSO₄·7H₂O, 0,75 ml de solución de metales traza de *Trichoderma reesei*, y 1,8 ml de ácido plurónico.

60

El medio alimento estaba compuesto por litro de 600 g de glucosa, 20 g de celulosa B800, 35,5 g de H₃PO₄, y 5 ml de ácido plurónico.

Ensayo de actividad de beta-glucosidasa

65

Para las muestras de *Trichoderma reesei*, la actividad de beta-glucosidasa se determinó a temperatura ambiente usando 25 μ l de partes alícuotas de sobrenadantes de cultivo, diluido 1:10 en 50 mM de succinato a pH 5.0, usando 200 μ l de 0,5 mg/ml de p-nitrofenilo-beta-D-glucopiranosida como sustrato en 50 mM de succinato a pH 5.0. Después

ES 2 350 903 T3

de 15 minutos de incubación la reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de 1 M de Tris-HCl a pH 8.0 y la absorbancia se leyó espectrofotométricamente a 405 nm.

5 Para muestras de *Saccharomyces cerevisiae*, muestras de sobrenadante del cultivo se diluyeron 0,6 veces con 0,1 M de succinato a pH 5.0 en placas de microtitulación de 96 pocillos. Veinte cinco μ l de las muestras diluidas fueron tomados de cada pocillo y añadidos a una nueva placa de 96 pocillos, conteniendo 200 μ l de 1 mg/ml de sustrato de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosida. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas y la reacción se detuvo añadiendo 2 M de Tris-HCl a pH 9. Las placas se leyeron luego espectrofotométricamente a 405 nm.

10 Una unidad de actividad beta-glucosidasa correspondió a la producción de 1 μ mol de p-nitrofenilo por minuto por litro a pH 5.0, a temperatura ambiente. Se usó beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novozyme 188, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) como un estándar enzimático.

15 *Secuenciación del ADN*

La secuenciación del ADN se realizó en un ABI3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando química de terminador colorante (Giesecke *et al.*, 1992, Journal of Virol. Methods 38: 47-60). Las secuencias se formularon usando phred/phrap/consed (University of Washington, Seattle WA) con cebadores específicos de secuencia.

20

Ejemplo 1

Construcción del vector de expresión pAILo1

25

El vector de expresión pAILo1 se construyó modificando pBANE6 (patente estadounidense 6.461.837), el cual comprende el promotor NA2-tpi, la secuencia del terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus Niger* (terminador AMG), y el gen de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* (amdS). La modificación de pBANE6 se realizó en primer lugar eliminando tres sitios de restricción NcoI en las posiciones 2051, 2722, y 3397 par de bases del marcador de selección amdS por mutagénesis sitio-dirigida. Todos cambios se diseñaron para ser “silenciosos” dejando la secuencia de proteína real del producto genético de amdS invariado. La eliminación de estos tres sitios se realizó simultáneamente con un GeneEditor Site-Directed Mutagenesis Kit (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante usando los cebadores siguientes (el nucleótido subrayado representa la base cambiada):

35

AMDS3NcoMut (2050): 5'-GTGCCCCATGATACGCCTCCGG-3' (SEC ID nº: 1)

AMDS2NcoMut (2721): 5'-GAGTCGTATTTCCAAGGCTCCTGACC-3' (SEC ID nº: 2)

AMDS1NcoMut (3396): 5'-GGAGGCCATGAAGTGGACCAACGG-3' (SEC ID nº: 3)

40

Un plásmido comprendiendo los tres cambios de secuencia previstos se sometió luego a mutagénesis sitio-dirigida, usando un QuickChange Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA), para eliminar el sitio de restricción Nco I al final del terminador AMG en la posición 1643. Los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada) se usaron para la mutagénesis:

45

Cebador superior para mutagenizar la secuencia del terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AMG):

5'-CACCGTGAAAGCCATGCTCTTTCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG-3' (SEC ID nº: 4)

50

Cebador inferior para mutagenizar la secuencia del terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AMG):

5'-CTGGTCTTCTACACGAAGGAAAGAGCATGGCTTTACGGTGTCTG-3' (SEC ID nº: 5)

55

La última fase en la modificación de pBANE6 fue la adición de un nuevo sitio de restricción Nco I en el principio del poliligador usando un QuickChange Mutagenesis Kit y los siguientes cebadores (los nucleótidos subrayados representan las bases cambiadas) para producir pAILo1 (Figura 1).

60

Cebador superior para mutagenizar el promotor de amilasa de *Aspergillus niger* (NA2-tpi):

5'-CTATATACACAACTGGATTTTACCATGGGCCCGCGGCCGAGATC-3' (SEC ID nº: 6)

65

Cebador inferior para mutagenizar el promotor de amilasa de *Aspergillus niger* (NA2-tpi):

5'-GATCTGCGGCCGCGGGCCATGGTAAATCCAGTTGTGTATATAG-3' (SEC ID nº: 7)

ES 2 350 903 T3

El gen *amdS* de *pAILo1* se cambió por el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans*. El plásmido *pBANE10* (Figura 14) se usó como una fuente para el gen *pyrG* como marcador de selección. El análisis de la secuencia de *pBANE10* mostró que el marcador *pyrG* estaba contenido dentro de un fragmento de restricción *NsiI* y no contiene ninguno de los sitios de restricción *NcoI* o *PacI*. Puesto que el *amdS* también está flanqueado por los sitios de restricción *NsiI*, la estrategia para cambiar el marcador de selección fue un simple cambio de fragmentos de restricción de *NsiI*. ADN plásmido a partir de *pAILo1* y *pBANE10* se digirió con la enzima de restricción *NsiI* y los productos se purificaron por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento *NsiI* de *pBANE10* conteniendo el gen *pyrG* se ligó al esqueleto de *pAILo1* para reemplazar el fragmento de ADN *NsiI* original conteniendo el gen *amdS*. Los clones recombinantes se analizaron por digestión de la restricción para determinar que éstas tienen el inserto correcto y también su orientación. Se seleccionó un clon con el gen *pyrG* transcrito en el sentido contrario a las agujas del reloj. El plásmido nuevo se ha designado como *pAILo2* (Figura 15).

Ejemplo 2

Construcción del vector de expresión *pMJ04*

El vector de expresión *pMJ04* se construyó por PCR amplificando el terminador del gen exocellobiohidrolasa 1 de *Trichoderma reesei* (*cbh1*) a partir de ADN genómico *RutC30* de *Trichoderma reesei* usando los cebadores 993429 (antisentido) y 993428 (sentido) mostrados abajo. El cebador antisentido se creó genéticamente para tener un sitio *PacI* en el extremo 5' y un sitio *SpeI* en el extremo 3' del cebador sentido.

Cebador 993429 (antisentido):

5'-AACGTTAATTAAGGAATCGTTTTGTGTTT-3' (SEC ID n°: 8)

Cebador 993428 (sentido):

5'-AGTACTAGTAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG-3' (SEC ID n°: 9)

Se aisló ADN genómico de *RutC30* de *Trichoderma reesei* usando un DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Chatsworth, CA).

Las reacciones de amplificación (50 μ l) fueron compuestas de 1X ThermoPol Reaction Buffer (New England Biolabs, Beverly, MA), 0,3 mM de dNTPs, 100 ng de ADN genómico de *RutC30* de *Trichoderma reesei*, 0,3 μ M de cebador 993429, 0,3 μ M de cebador 993428, y 2 unidades de VENT polimerasa (New England Biolabs, Beverly, MA). Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY) programado de la siguiente manera: 5 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 65°C, y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando 40 mM de base de Tris-20 mM de sodio acetato-1 mM de tampón EDTA de disodio (TAE) donde una banda de producto de 229 par de bases se cortó a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de PCR resultante se digirió con *PacI* y *SpeI* y se ligó en *pAILo01* digerido con las mismas enzimas de restricción usando un Rapid Ligation Kit (Roche, Indianapolis, IN), para generar *pMJ04* (Figura 2).

Ejemplo 3

Construcción del vector de expresión *pCaHj568*

El plásmido de expresión *pCaHj568* se construyó a partir de *pCaHj170* (patente estadounidense 5.763.254) y *pMT2188*. El plásmido *pCaHj170* comprende la región de codificación de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* (EGV). El plásmido *pMT2188* se construyó de la siguiente manera: El origen de replicación de *pUC19* fue PCR amplificado a partir de *pCaHj483* (WO 98/00529) con los cebadores 142779 y 142780 mostrados abajo. El cebador 142780 introduce un sitio *BbuI* en el fragmento de PCR.

142779: 5'-TTGAATTGAAAATAGATTGATTAAAACCTTC-3' (SEC ID n°: 10)

142780: 5'-TTGCATGCGTAATCATGGTCATAGC-3' (SEC ID n°: 11)

El sistema Expand PCR (Roche Molecular Biochemicals, Basilea, Suiza) se usó para la amplificación siguiendo las instrucciones del fabricante para ésta y las amplificaciones de PCR posteriores. Los productos de PCR se separaron en un 1% de gel de agarosa usando tampón TAE y un fragmento de 1160 par de bases se aisló y purificó usando un Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, Wielandstr, Alemania).

ES 2 350 903 T3

El gen URA3 se amplificó a partir del vector de clonación piES2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los cebadores 140288 y 142778 de abajo. El cebador 140288 introduce un sitio Eco RI en el fragmento de PCR.

5 140288: 5'-TTGAATTCATGGGTAATAACTGATAT-3' (SEC ID nº: 12)

142778: 5'-AAATCAATCTATTTTCAATTCAATTCATCATT-3' (SEC ID nº: 13)

10 Los productos de PCR se separaron en un 1% de gel de agarosa usando tampón TAE y un fragmento de 1126 par de bases se aisló y purificó usando un Jetquick Gel Extraction Spin Kit.

15 Los dos fragmentos de PCR se fundieron mediante mezcla y amplificación usando los cebadores 142780 y 140288 mostrados arriba mediante el método de unión por recubrimiento (Horton *et al.*, 1989, *Gene* 77: 61-68). Los productos de PCR se separaron en un 1% de gel de agarosa usando tampón TAE y un fragmento de 2263 par de bases se aisló y purificó usando un Jetquick Gel Extraction Spin Kit.

20 El fragmento resultante se digirió con EcoRI y BbuI y se ligó al fragmento más grande de pCaHj483 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligadura se usó para transformar la cepa DB6507 de *E. coli* pyrF negativa (ATCC 35673) hecha competente por el método de Mandel e Higa, 1970, *J. Mol. Biol.* 45: 154. Se seleccionaron transformantes en medio M9 sólido (Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press) suplementado por litro con 1 g de casaminoácidos, 500 µg de tiamina, y 10 mg de canamicina. Un plásmido de un transformante se aisló y designó pCaHj527 (Figura 3).

25 El promotor NA2/tpi presente en pCaHj527 se sometió a mutagénesis sitio dirigida por un enfoque de PCR simple. Los nucleótidos 134-144 se convirtieron de GTACTAAAACC a CCGTTAAATTT usando el cebador mutagénico 141223:

30 Cebador 141223: 5'-GGATGCTGTTGACTCCGGAAATTTAACGGTTTGGTCTTGCATCCC-3' (SEC ID nº: 14)

Los nucleótidos 423-436 se convirtieron de ATGCAATTTAAACT a CGGCAATTTAACGG usando el cebador mutagénico 141222:

35 Cebador 141222: 5'-GGTATTGTCCTGCAGACGGCAATTTAACGGCTTCTGCGAATCGC-3' (SEC ID nº: 15)

El plásmido resultante se designó pMT2188 (Figura 4).

40 La región de codificación de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* se transfirió de pCaHj170 como un fragmento BamHI-SalI en pMT2188 digerido con BamHI y XhoI para generar pCaHj568 (Figura 5).

Ejemplo 4

45 *Construcción del vector de expresión pMJ05*

50 El vector de expresión pMJ05 se construyó por PCR amplificando la región de codificación de la endoglucanasa V de 915 par de bases de *Humicola insolens* a partir de pCaHj568 usando los cebadores HiEGV-F y HiEGV-R mostrados abajo.

HiEGV-F (sentido): 5'-AAGCTTAAGCATGCGTTCCTCCCCCTCC-3' (SEC ID nº: 16)

55 HiEGV-R (antisentido): 5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEC ID nº: 17)

60 Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas por 1X de tampón de reacción TermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 10 ng/µl de plásmido pCaHj568, 0,3 µM de cebador HiEGV-F, 0,3 µM de cebador HiEGV-R, y 2 unidades de Vent polimerasa. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 65°C, y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde un producto de banda de 937 par de bases se extrajo a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

65

ES 2 350 903 T3

Este fragmento purificado de 937 par de bases se usó como patrón de ADN para amplificaciones posteriores usando los cebadores siguientes:

HiEGV-R (antisentido): 5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEC ID n°: 18)

HiEGV-F-recubrimiento (sentido): 5'-ACCGCGGACTGCGCATCATGCGTTCCTCCCCCTCC-3' (SEC ID n°: 19)

Las secuencias de cebador en cursiva son homólogas por 17 par de bases del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas por 29 par de bases de la región de codificación de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*. El recubrimiento de 36 par de bases entre el promotor y la secuencia codificante permitió la fusión precisa del fragmento de 994 par de bases comprendiendo el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* al fragmento de 918 par de bases comprendiendo el marco de lectura abierto de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*.

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por 1X de tampón de reacción ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 1 μ l de fragmento de PCR purificado de 937 par de bases, 0,3 μ M de cebador de HiEGV-F-recubrimiento, 0,3 μ M de cebador HiEGV-R, y 2 unidades de Vent polimerasa. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 65°C, y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 945 par de bases se extrajo del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

Un PCR separado se realizó para amplificar la secuencia promotora *cbh1* de *Trichoderma reesei* que se extiende desde 994 par de bases corriente arriba del codón de iniciación ATG del gen a partir del ADN genómico RutC30 de *Trichoderma reesei* usando los cebadores siguientes (el cebador de sentido se creó genéticamente para tener un sitio de restricción Sal I en el extremo 5'):

TrCBH1pro-F (sentido): 5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEC ID n°: 20)

TrCBH1pro-R (antisentido): 5'-GATGCGCAGTCCGCGGT-3' (SEC ID n°: 21)

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por 1X de tampón de reacción ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 100 ng de ADN genómico RutC30 de *Trichoderma reesei*, 0,3 μ M de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 μ M de cebador TrCBH1pro-R, y 2 unidades de Vent polimerasa. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 55°C, y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 998 par de bases se extrajo a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de PCR purificado de 998 par de bases se usó para como patrón de ADN para amplificaciones posteriores usando los cebadores siguientes:

TrCBH1pro-F: 5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEC ID n°: 22)

TrCBH1pro-R-recubrimiento: 5'-GGAGGGGGGAGGAACGCATGATGCGCAGTCCGCGGT 3' (SEC ID n°: 23)

Las secuencias en cursiva son homólogas por 17 par de bases del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias subrayadas son homólogas por 29 par de bases de la región de codificación de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*. El recubrimiento de 36 par de bases entre el promotor y la secuencia codificante permitió la fusión precisa del fragmento de 994 par de bases comprendiendo el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* al fragmento de 918 par de bases comprendiendo el marco de lectura abierto de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*.

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por 1X de tampón de reacción ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 1 μ l de fragmento de PCR purificado de 998 par de bases, 0,3 μ M cebador TrCBH1pro-F, 0,3 μ M de cebador TrCBH1pro-R-recubrimiento, y 2 unidades de Vent polimerasa. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 65°C, y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 1017 par de bases se extrajo a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

ES 2 350 903 T3

El fragmento de PCR de promotor *cbh1* de 1017 par de bases de *Trichoderma reesei* y los fragmentos de PCR de la endoglucanasa V 945 par de bases de *Humicola insolens* se usaron como patrón de ADN para la amplificación posterior usando los cebadores siguientes para fusionar de forma precisa el promotor *cbh1* de 994 par de bases de *Trichoderma reesei* a la región de codificación de la endoglucanasa V de 918 par de bases de *Humicola insolens* usando de superposición de PCR.

TrCBH1pro-F: 5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEC ID n°: 24)

HiEGV-R: 5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEC ID n°: 25)

10

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por 1X de tampón de reacción ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 0,3 μ M de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 μ M de cebador HiEGV-R, y 2 U de Vent polimerasa. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C, 30 segundos a 65°C, y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 1926 par de bases se extrajo a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de 1926 par de bases resultante se clonó en el vector pCR-Blunt-II-TOPO usando un Zero Blunt™ TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El plásmido resultante se digirió con NotI y SalI y el fragmento de 1926 par de bases purificado y ligado en el vector de expresión pMJ04 el cual también se digirió con las dos mismas enzimas de restricción, para generar pMJ05 (Figura 6).

25

Ejemplo 5

Construcción del vector de expresión pSMai130

Un fragmento de ADN de 2586 par de bases abarcando desde el codón de iniciación ATG hasta el codón de detención TAA de la secuencia codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (SEC ID n°: 42 para la secuencia de ADNc y la SEC ID n°: 43 para la secuencia de aminoácido deducida; *E. coli* DSM 14240) se amplificó por PCR a partir de pJaL660 (WO 2002/095014) como patrón con los cebadores 993467 (sentido) y 993456 (antisentido) mostrados abajo. Un sitio SpeI se creó genéticamente en el extremo 5' del cebador antisentido para facilitar la ligación. Las secuencias de cebador en cursiva son homólogas a 24 par de bases del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias subrayadas son homólogas a 22 par de bases de la región de codificación de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Cebador 993467: 5'-ATAGTCAACCGCGGACTGCGCATCATGAAGCTTGGTTGGATCGAGG-3' (SEC ID n°: 26)

Cebador 993456: 5'-ACTAGTTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEC ID n°: 27)

45

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por tampón de amplificación Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 mM de dNTPs, 10 ng de plásmido pJaL660, 6,4 μ M de cebador 993467, 3,2 μ M de cebador 993456, 1 mM de MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa ofPfx (Invitrogen, Carlsbad, California). Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 60 segundos cada uno a 94°C, 60 segundos a 55°C, y 180 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 2586 par de bases se extrajo a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

Se realizó un PCR separado para amplificar la secuencia promotora *cbh1* de *Trichoderma reesei* la cual se extiende desde 1000 par de bases corriente arriba del codón de iniciación ATG del gen, usando el cebador 993453 (sentido) y el cebador 993463 (antisentido) mostrado abajo para generar un fragmento de PCR de 1000 par de bases. Las secuencias de cebador en cursiva son homólogas al promotor *cbh1* de 24 par de bases de *Trichoderma reesei* y secuencias de cebador subrayadas son homólogas al Región de codificación de la beta-glucosidasa de 22 par de bases de *Aspergillus oryzae*. El recubrimiento de 46 par de bases entre el promotor y la secuencia codificante permite la fusión precisa del fragmento de 1000 par de bases comprendiendo el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* al fragmento de 2586 par de bases comprendiendo el marco de lectura abierto de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Cebador 993453: 5'-GTCGACTCGAAGCCCGAATGTAGGAT-3' (SEC ID n°: 28)

Cebador 993463: 5'-CCTCGATCCAACCAAGCTTCATGATGCGCAGTCCGCGGTTGACTA-3' (SEC ID n°: 29)

65

ES 2 350 903 T3

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por tampón de amplificación Pfx, 0,25 mM dNTPs, 100 ng de ADN genómico RutC30 de *Trichoderma reesei*, 6,4 μ M de cebador 993453, 3,2 μ M de cebador 993463, 1 mM de MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 60 segundos cada uno a 94°C, 60 segundos a 55°C, y 180 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 1000 par de bases se extrajo del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos purificados se usaron como patrón de ADN para la amplificación posterior usando el cebador 993453 (sentido) y el cebador 993456 (antisentido) mostrado arriba para fusionar de forma precisa el fragmento de 1000 par de bases comprendiendo el promotor cbh1 de *Trichoderma reesei* al fragmento de 2586 par de bases comprendiendo el marco de lectura abierto de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* por superposición de PCR.

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por tampón de amplificación Pfx, 0,25 mM de dNTPs, 6,4 μ M de cebador 99353, 3,2 μ M de cebador 993456, 1 mM de MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 60 segundos cada uno a 94°C, 60 segundos a 60°C, y 240 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos).

El fragmento de 3586 par de bases resultante se digirió con SalI y SpeI y se ligó en pMJ04, digerido con las dos mismas enzimas de restricción, para generar pSMai130 (Figura 7).

Ejemplo 6

25 Construcción de pSMai135

La región de codificación de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (menos la secuencia señal nativa, véase Figura 8) desde Lys-20 hasta el codón de detención TAA se amplificó por PCR a partir de pJaL660 como patrón con el cebador 993728 (sentido) y el cebador 993727 (antisentido) mostrado abajo. Las secuencias en cursiva son homólogas por 20 par de bases de la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* y las secuencias subrayadas son homólogas por 22 par de bases de la región de codificación de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Un sitio SpeI se creó genéticamente en el extremo 5' del cebador antisentido.

993728: 5'-TGCCGGTGTGGCCCTTGCCAAGGATGATCTCGCGTACTCCC-3' (SEC ID n°: 30)

Cebador 993727: 5'-GACTAGTCTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEC ID n°: 31)

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por tampón de amplificación Pfx, 0,25 mM de dNTPs, 10 ng/ μ l de pJaL660, 6,4 μ M de cebador 993728, 3,2 μ M de cebador 993727, 1 mM de MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 60 segundos cada uno a 94°C, 60 segundos a 55°C, y 180 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 2523 par de bases se extrajo del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

Se realizó una amplificación por PCR separada para amplificar 1000 par de bases del promotor cbh1 de *Trichoderma reesei* y 63 par de bases de la secuencia señal putativa de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* (codón de iniciación ATG a Ala-21, Figura 9, SEC ID n°: 36), usando el cebador 993724 (sentido) y el cebador 993729 (antisentido) mostrado abajo. Las secuencias de cebador en cursiva son homólogas por 20 par de bases de la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas a los 22 par de bases de la región de codificación de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. El plásmido pMJ05, el cual comprende la región de codificación de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* bajo el control del promotor cbh1, se usó como un patrón para generar un fragmento de 1063 par de bases comprendiendo el promotor cbh1 de *Trichoderma reesei*/fragmento de secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*. Un recubrimiento de 42 par de bases se compartió entre el promotor cbh1 de *Trichoderma reesei*/secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* y la secuencia de codificación de *Aspergillus oryzae* para proporcionar un enlace perfecto entre el promotor y el codón de iniciación ATG de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de 2523 par de bases.

Cebador 993724: 5'-ACGCGTTCGACCGAATGTAGGATTGTTATCC-3' (SEC ID n°: 32)

Cebador 993729: 5'-GGGAGTACGCGAGATCATCCTTGGCAAGGGCCAACACCGGCA-3' (SEC ID n°: 33)

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por tampón de amplificación Pfx, 0,25 mM de dNTPs, 10 ng/ μ l de pMJ05, 6,4 μ M de cebador 993728, 3,2 μ M de cebador 993727, 1 mM de MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 60 segundos cada uno a 94°C, 60 segundos a 60°C, y 240 segundos a 72°C (extensión final de 15

ES 2 350 903 T3

minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 1063 par de bases se extrajo a partir del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

5 Los fragmentos de superposición purificados se usaron como un patrón para la amplificación usando el cebador 993724 (sentido) y el cebador 993727 (antisentido) anteriormente descritos para fusionar de forma precisa el fragmento de 1063 par de bases comprendiendo el promotor cbh1 de *Trichoderma reesei*/secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* al fragmento de 2523 par de bases comprendiendo el marco de lectura abierto de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* por superposición de PCR.

10 Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por tampón de amplificación Pfx, 0,25 mM de dNTPs, 6,4 μ M de cebador 993724, 3,2 μ M de cebador 993727, 1 mM de MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos de 60 segundos cada uno a 94°C, 60 segundos a 60°C, y 240 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 3591 par de bases se extrajo del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

15 El fragmento de 3591 par de bases resultante se digirió con Sall y SpeI y se ligó en pMJ04 digerido con las mismas enzimas de restricción para generar pSMai135 (Figura 10).

20

Ejemplo 7

25 *Expresión de beta-glucosidasa de Aspergillus oryzae comparando la señal de secreción nativa y heteróloga endoglucanasa V de Humicola insolens en Trichoderma reesei*

30 El plásmido pSMai130, en el cual la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* se expresa a partir del promotor cbh1 y la señal de secreción nativa (Figura 8, SEC ID Nos: 34 (secuencia de ADN) y 35 (secuencia de aminoácidos deducida), o pSMai135 codificando la enzima madura de *Aspergillus oryzae* enlazada a la señal de secreción de beta-glucosidasa vinculada a la endoglucanasa V de *Humicola insolens* (Figura 9, SEC ID Nos: 36 (secuencia de ADN) y 37 (secuencia de aminoácidos deducida), se introdujo en RutC30 de *Trichoderma reesei* por transformación mediada por PEG (Penttila *et al.*, 1987, *supra*). Ambos plásmidos contienen el gen amdS de *Aspergillus nidulans* para permitir que los transformantes crezcan en acetamida como la única fuente de nitrógeno.

35 El RutC30 de *Trichoderma reesei* se cultivó a 27°C y 90 r.p.m. En 25 ml de medio YP suplementado con un 2% (p/v) de glucosa y 10 mM de uridina durante 17 horas. Los micelios se recogieron por filtración usando el Millipore's Vacuum Driven Disposable Filtration System (Millipore, Bedford, MA) y se lavaron dos veces con agua desionizada y dos veces con 1,2 M de sorbitol. Los protoplastos se generaron suspendiendo los micelios lavados en 20 ml de 1,2 M de sorbitol conteniendo 15 mg de Glucanex (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) por ml y 0,36 unidades de quitinasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por ml e incubándolos durante 15-25 minutos a 34°C con agitación suave a 90 r.p.m. Los protoplastos se recogieron por centrifugado durante 7 minutos a 400 x g y se lavaron dos veces con 1,2 M de sorbitol frío. Los protoplastos se contaron usando un hemacitómetro y se resuspendieron en STC hasta llegar a una concentración final de 1 X 10⁸ protoplastos por ml. El exceso de protoplastos se almacenó en un contenedor criogénico Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Rochester, NY) a -80°C.

45 Aproximadamente 7 μ g de plásmido de expresión PME I digerido (pSMai130 o pSMai135) se añadieron a 100 μ l de solución de protoplasto y se mezclaron suavemente, seguido de 260 μ l de tampón PEG, mezclado, e incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se añadió STC (3 ml), se mezcló y la solución de transformación se colocó sobre placas COVE usando selección amdS de *Aspergillus nidulans*. Las placas se incubaron a 28°C durante 5-7 días. Los transformantes se sub-cultivaron sobre placas COVE2 y se maduraron a 28°C.

50 Ciento diez transformantes positivos de amdS se obtuvieron con pSMai130 y 65 transformantes con pSMai135. Veinte transformantes designaron el SMA130 obtenido con pSMai130 (señal de secreción nativa) y 67 transformantes designaron el SMA135 obtenido con pSMai135 (señal de secreción heteróloga) se subcultivaron sobre placas nuevas conteniendo acetamida y se dejaron esporular durante 7 días a 28°C.

60 Los 20 transformantes de SMA130 y los 67 transformantes de SMA135 de *Trichoderma reesei* se cultivaron en frascos de agitación dispados de 125 ml conteniendo 25 ml de medio de inducción de celulasa a pH 6.0 inoculados con esporas de los transformantes e incubados a 28°C y 200 r.p.m. durante 7 días. El RutC30 de *Trichoderma reesei* se utilizó como un control. Las muestras de caldo de cultivo se retiraron el día 7. Un ml de cada caldo de cultivo se centrifugó a 15.700 x g durante 5 minutos en un micro-centrifugador y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se almacenaron muestras a 4°C hasta el ensayo enzimático. Los sobrenadantes se sometieron a ensayo para observar la actividad beta-glucosidasa usando p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosida como sustrato, como se ha descrito anteriormente.

65 Todos y cada uno de los 20 transformantes de SMA130 mostraron actividad beta-glucosidasa equivalente a la de la cepa huésped, RutC30 de *Trichoderma reesei*. En cambio, varios transformantes de SMA135 mostraron actividades beta-glucosidasa varias veces mayor que la de RutC30 de *Trichoderma reesei*. El transformante SMA135-04 produjo

ES 2 350 903 T3

la mayor actividad beta-glucosidasa teniendo 7 veces más actividad beta-glucosidasa que la producida por RutC30 de *Trichoderma reesei* como control.

La SDS-PAGE se efectuó usando los geles (5% de resolución) Criterion Tris-HCl (BioRad, Hercules, CA) con The Criterion System (BioRad, Hercules, CA). Cinco μ l de sobrenadantes del día 7 (véase arriba) se suspendieron en una concentración de 2X de tampón Laemmli Sample Buffer (BioRad, Hercules, CA) y se hirvieron en presencia de un 5% de beta-mercaptoetanol durante 3 minutos. Las muestras de sobrenadantes se colocaron sobre un gel de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis con 1X de Tris/Glicina/SDS como tampón de desplazamiento (BioRad, Hercules, CA). El gel resultante se manchó con Safe Coomassie Stain de BioRad.

No se hizo visible ninguna proteína de beta-glucosidasa mediante SDS-PAGE para los sobrenadantes del caldo de cultivo transformantes de SMA130 de *Trichoderma reesei*. En cambio, 26 de los 38 transformantes de SMA135 de *Trichoderma reesei* produjeron una proteína de aproximadamente 110 kDa que no fue visible en RutC30 de *Trichoderma reesei* como control. el transformante *Trichoderma reesei* SMA135-04 produjo el mayor nivel de beta-glucosidasa.

Ejemplo 8

Fermentación de *Aspergillus oryzae* SMA135-04

La fermentación se realizó sobre *Aspergillus oryzae* SMA135-04 para determinar el nivel de producción de actividad beta-glucosidasa. La *Trichoderma reesei* RutC30 (cepa huésped) se utilizó como control. Esporas de *Trichoderma reesei* SMA135-04 se inocularon en matraces de agitación de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio inóculo. Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 28°C durante aproximadamente 48 horas tras las cuales se inocularon 50 ml del cultivo en 1,8 litros de medio de fermentación (véase arriba) en un vaso de fermentación de 2 litros. Las fermentaciones se realizaron a pH 5.0, 28°C, con oxígeno disuelto mínimo a un 25% a un 1,0 WM de flujo de aire y una agitación de 1100. El medio alimenticio se administró en el vaso de fermentación a las 18 horas con una velocidad de administración de 3,6 g/hora durante 33 horas y después de 7,2 g/hora. Las fermentaciones se realizaron durante 165 horas tras las cuales se centrifugaron los caldos de fermentación finales y se almacenaron los sobrenadantes a -20°C hasta el ensayo de actividad beta-glucosidasa usando el procedimiento anteriormente descrito.

La actividad beta-glucosidasa en la muestra de fermentación de *Trichoderma reesei* SMA135-04 se determinó como aproximadamente 8 veces más activa que la de *Trichoderma reesei* RutC30.

Ejemplo 9

Construcción de los vectores de expresión de *Saccharomyces cerevisiae* pSATE111 y pALFd1

Un fragmento de ADN de 2,605 par de bases comprendiendo la región que va desde el codón de iniciación ATG hasta el codón de detención TAA de la secuencia codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (SEC ID n°: 42 para la secuencia de ADNc y SEC ID n°: 43 para la secuencia de aminoácidos deducida) se amplificó por PCR a partir de pJaL660 (WO 2002/095014) como patrón con los cebadores 992127 (sentido) y 992328 (antisentido) mostrados abajo:

992127: 5'-GCAGATCTACCATGAAGCTTGGTTGGATCGAG-3' (SEC ID n°: 38)

992328: 5'-GCCTCAGATTACTGGGCCTTAGGCAGCGAG-3' (SEC ID n°: 39)

El cebador 992127 tiene un sitio BglIII superior y el cebador 992328 tiene un sitio XhoI inferior.

Las reacciones de amplificación (50 μ l) estaban compuestas por 1X de tampón PCR conteniendo MgCl₂ (Roche Applied Science, Manheim, Alemania), 0,25 mM de dNTPs, 50 μ M de cebador 992127, 50 μ M de cebador 992328, 80 ng de pJaL660, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pwo (Roche Applied Science, Manheim, Alemania). Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado para 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos seguidos de 25 ciclos cada uno a 94°C durante 60 segundos, a 55°C durante 60 segundos, y a 72°C durante 120 segundos (extensión final de 10 minutos). El producto de PCR se subclonó entonces en el vector Blunt II-TOPO usando el TOPO PCR Cloning Kit TOPO ZeroBlunt™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante para generar el plásmido pSATE101 (Figura 11). El plásmido pSATE101 se digirió con BglIII y XhoI para liberar el gen de beta-glucosidasa. Los productos reactivos se aislaron en un 1,0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto de 2,6 kb se extrajo del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

ES 2 350 903 T3

El producto de PCR de 2,6 kb se digirió y se clonó en los sitios BamHI y XhoI del vector de expresión pCu426 de 2 μ M de levadura inducible mediante cobre (Labbe y Thiele, 1999, Methods Enzymol. 306: 145-53), para generar pSATE111 (Figura 12).

5 El plásmido pALFd1 se construyó para determinar si la producción mejorada de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* y la secreción podrían conseguirse también en *Saccharomyces cerevisiae* intercambiando la señal de secreción de beta-glucosidasa nativa de *Aspergillus oryzae* con el péptido señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*.

10 El plásmido pSATE111 se digirió con XhoI y SpeI para liberar los fragmentos de 2,6 kb (beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*) y 6 kb (resto del vector). El fragmento de 6 kb se aisló y ligó al fragmento de PCR de 2,6 kb, conteniendo la región de codificación de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (menos la secuencia señal de secreción) y la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*, la cual se amplificó a partir de pSMai135 usando los cebadores 993950 y 993951 mostrados abajo. Los cebadores contienen los sitios de restricción XhoI y SpeI en sus extremos para la subclonación posterior en los sitios de restricción XhoI y SpeI de pSATE111.

15 993950: 5'-AATCCGACTAGTGGATCTACCATGCGTTCCTCCCCCTCC-3' (SEC ID n°: 40)

Cebador 993951: 5'-GCGGGCCTCGAGTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEC ID n°: 41)

20 Las reacciones de amplificación (100 μ l) estaban compuestas de tampón Thermo Pol Buffer de PCR, 0,20 mM de dNTPs, 0,14 μ g de ADN plásmido de pSMai135, 50 μ M de cebador 993950, 50 μ M de cebador 993951, y 2 unidades de Vent ADN polimerasa. Las reacciones se incubadas en un RoboCycler Gradient 40 Thermal Cycler (Stratagene, La Jolla, CA) programado de la siguiente manera: un ciclo de 1 minuto a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto cada uno a 95°C, 1 minuto a 60°C o 64°C, y 3 minutos a 72°C (extensión final de 10 minutos). Los productos reactivos se hicieron visibles en un 0,7% de gel de agarosa usando tampón TAE. Las bandas de fragmento de 2,6 kb resultantes se purificaron usando un MinElute PCR Purification de PCR (QIAGEN, Chatsworth, CA) según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados se combinaron y digirieron con XhoI y SpeI y se ligaron en pSATE111 digerido con las dos mismas enzimas de restricción para generar pALFd1 (Figura 13).

30

Ejemplo 10

35 *Expresión de beta-glucosidasa de Aspergillus oryzae comparando la señal de secreción nativa y heteróloga en Saccharomyces cerevisiae*

El plásmido pALFd1 (aproximadamente 600 ng) se transformó en células competentes recién creadas de *Saccharomyces cerevisiae* YNG 318 según el protocolo YEASTMAKER Yeast Transformation Protocol, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA. Las células transformadas se colocaron sobre placas de selección de levadura conteniendo 0,15 mg del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucopiranosida por ml, el cual produce colonias azules cuando la beta-glucosidasa está presente. Las placas se incubaron a 30°C durante 4 días.

45 Las colonias conteniendo el vector de expresión con la señal de secreción de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* eran generalmente de un color azul más oscuro que las colonias que el que tenía la secuencia señal de beta-glucosidasa nativo de *Aspergillus oryzae*, indicando que se segregó más beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* usando la señal de secreción de la endoglucanasa V de *Humicola insolens*. Aproximadamente, 242 colonias azules de ambos constructos se escogieron usando un recolector de colonias automatizado (QPix, Genetix USA, Inc., Boston, MA). Los 242 transformantes se inocularon en medio de selección de levadura (el cual contiene cobre) para inducir la expresión y la secreción de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Se tomó caldo del día 7 del cultivo de 96 pocillos de cada una de las 245 colonias y se sometió a ensayo para observar la actividad beta-glucosidasa usando p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosida como sustrato como se ha descrito anteriormente. Los resultados mostraron que las colonias expresando beta-glucosidasa con la secuencia señal heteróloga eran 6,6 veces más activas que las colonias que se transformaron con la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* con la señal de secreción nativa.

55

Ejemplo 11

Identificación de un gen de la familia GH3A de la glicosil hidrolasa en la secuencia genómica de Aspergillus fumigatus

60 Una búsqueda tblastn (Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) de la secuencia genómica parcial de *Aspergillus fumigatus* (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD) se efectuó usando como criterio de búsqueda una secuencia de proteína de beta-glucosidasa a partir de *Aspergillus aculeatus* (N° de Acceso P48825). Diferentes genes se identificaron como homólogos putativos de la familia GH3A en base a un alto grado de similitud con la secuencia del criterio de búsqueda en el nivel aminoácido. Una región genómica de aproximadamente 3000 par de bases con más de un 70% de identidad con la secuencia del criterio de búsqueda en el nivel aminoácido se seleccionó elegido para un posterior estudio.

65

ES 2 350 903 T3

Ejemplo 12

Extracción de ADN genómico de Aspergillus fumigatus

5 *Aspergillus fumigatus* PaHa34 se cultivó en 250 ml de medio de dextrosa de patata en un matraz de agitación
disipado a 37°C y 240 r.p.m. Los micelios se cosecharon por filtración, se lavaron dos veces en tampón TE (10 mM
de Tris-1 mM de EDTA), y se congelaron bajo nitrógeno líquido. Los micelios congelados se cultivaron por mortero
y a mano de mortero hasta obtener un polvo fino, el cual se resuspendió en tampón a pH 8.0 conteniendo 10 mM de
10 Tris, 100 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,5 M guanidina-HCl, y 200 mM de NaCl. Se añadió ribonucleasa A
sin ADNsa en una concentración de 20 µg/ml y el lisado se incubó a 37°C durante 30 minutos. El detrito celular se
eliminó por centrifugado, y el ADN se aisló usando una columna Qiagen Maxi 500 (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA).
Las columnas se equilibraron en 10 ml de QBT, se lavaron con 30 ml de QC, y se eluyeron con 15 ml de QF (todos
los tampones de QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). El ADN se precipitó en isopropanol, se lavó en un etanol al 70%, y
se recuperó por centrifugado. El ADN se resuspendió en tampón TE.

15

Ejemplo 13

Clonación del gen de beta-glucosidasa de la familia GH3A y construcción de un vector de expresión de Aspergillus oryzae

20

Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados abajo se diseñaron para amplificar por PCR un gen de Pa-
Ha34 de *Aspergillus fumigatus* codificando una beta-glucosidasa de la familia GH3A a partir del ADN genómico
preparado en el Ejemplo 14. Un InFusion Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA) se usó para clonar el frag-
25 mento directamente en el vector de expresión, pAllo2 (Figura 14), sin la necesidad de digestiones de restricción y
ligación.

Cebador directo: 5'-ACTGGATTTACCATGAGATTCGGTTGGCTCG-3' (SEC ID n°: 44)

30 Cebador inverso: 5'-AGTCACCTCTAGTTACTAGTAGACACGGGGC-3' (SEC ID n°: 45)

Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga a los sitios de inser-
ción de pAllo2, descritos en el Ejemplo 7.

35

Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores de arriba se usaron en una reacción de PCR conteniendo 100
ng de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus*, 1X Pfx de tampón de amplificación, 1,5 µl de 10 mM de mezcla de
DATP, dTTP, DGTP, y DCTP, 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx, 1 µl de 50 mM de MgSO₄ y 2,5 µl de 10X de
40 solución intensificadora pCRx (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 50 µl. Las reacciones se incubaron
en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: un ciclo a 94°C durante 2 minutos; y 30 ciclos
a 94°C cada uno durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 68°C durante 3 minutos. El bloque de calor pasó
entonces a un ciclo de remojo a 4°C.

Los productos reactivos se aislaron en un 1.0% de gel de agarosa usando tampón TAE donde una banda de producto
45 de 3 kb se extrajo del gel y se purificó usando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

El fragmento se clonó entonces en el vector de expresión pAllo2 usando un Infusion Cloning Kit. El vector
se digirió con NcoI y PacI. El fragmento se purificó por electroforesis en gel y purificación en gel QIAquick. El
fragmento de gen y el vector digerido se ligaron juntos en una reacción dando como resultado el plásmido de expresión
50 pEJG97 (Figura 15) en el cual transcripción del gen de beta-glucosidasa de la familia GH3A estaba bajo el control
del promotor NA2-tpi. La reacción de ligación (50 µl) estaba compuesta por 1X de tampón InFusion Buffer (BD
Biosciences, Palo Alto, CA), 1X de BSA (BD BioscienciasBiosciences, Palo Alto, CA), 1 µl de enzima de infusión
(diluido 1: 10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 150 ng de pAllo2 digerido con NcoI y PacI, y 50 ng del producto de
55 PCR purificado de la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante
30 minutos. Un µl de la reacción se usó para transformar células XL10 Solopac Gold de *E. coli* (Stratagene, La Jolla,
CA). Un transformante de *E. coli* conteniendo el plásmido pEJG97 se detectó por digestión de restricción del ADN
plásmido.

Ejemplo 14

Caracterización de la secuencia genómica de Aspergillus fumigatus codificando una beta-glucosidasa de la familia GH3A

65 La secuenciación del ADN del gen de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* a partir de pEJG97 se realizó como
se describe previamente usando una estrategia de desplazamiento de cebador. Un modelo de gen para la secuencia de
Aspergillus fumigatus se construyó en base a la similitud a genes homólogos de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus
niger*, y *Aspergillus kawachii*. La secuencia de nucleótidos (SEC ID n°: 46) y la secuencia de aminoácidos deducida

ES 2 350 903 T3

(SEC ID n°: 47) se muestran en la Figura 16. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 863 aminoácidos, interrumpido por 8 intrones de 62, 55, 58, 63, 58, 58, 63 y 51 par de bases. El contenido %G+C del gen es del 54.3%. Usando el programa de software SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 19 residuos. La proteína madura predicha contiene 844 aminoácidos con una masa molecular de 91,7 kDa.

Una alineación comparativa de secuencias de beta-glucosidasa se determinó usando el método Clustal W (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el Software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: Gap penalty de 10 y gap length penalty de 10. Los parámetros de alineación por pares fueron Ktuple=1, gap penalty=3, window=5, y diagonals=5. La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* comparte un 78%, 76%, y 76% de identidad a las secuencias de aminoácidos deducidas de las beta-glucosidasas del *Aspergillus aculeatus* (número de accesoión P48825), *Aspergillus niger* (número de accesoión 000089), y *Aspergillus kawachii* (número de accesoión P87076).

Ejemplo 15

Expresión del gen de beta-glucosidasa de la familia GH3A de Aspergillus fumigatus en Aspergillus oryzae JAL250

Se prepararon protoplastos de *Aspergillus oryzae* JAL250 según el método de Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Cinco μ g de pEJG97 (así como pAILo2 como control de vector) se usaron para transformar *Aspergillus oryzae* JAL250.

La transformación de *Aspergillus oryzae* JAL250 con pEJG97 liberó aproximadamente 100 transformantes. Diez transformantes se aislaron a placas PDA individuales.

Placas PDA confluyentes de cinco de los diez transformantes se lavaron con 5 ml de 0,01% Tween 20 y se inocularon separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml y se incubaron a 34°C, 250 r.p.m. Cinco días tras la incubación, 0,5 μ l de sobrenadante de cada cultivo se analizaron usando un 8-16% de geles de SDS-PAGE de Tris-Glicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Los perfiles SDS-PAGE de los cultivos mostraron de los transformantes (designado transformante 1) tenía una banda mayor de aproximadamente 130 kDa.

Ejemplo 16

Extracción del ARN total de Aspergillus oryzae

El transformante de *Aspergillus oryzae* descrito en Ejemplo 13 se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Posteriormente, el tejido congelado puso en un molinillo de café eléctrico con unos trozos pequeños de hielo seco adicionado para mantener los micelios en polvo congelados. Después, el material colocado se transfirió con una espátula a un tubo cónico estéril de 50 ml el cual se había rellenado previamente con 20 ml de Fenozol (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA). La mezcla se mezcló rápidamente para disolver el material congelado a una solución gruesa, y se colocó en un baño maría a 50°C durante 15 minutos. Cinco ml de cloroformo sin ribonucleasa se añadieron a la mezcla y ésta se removió enérgicamente. Luego, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después la mezcla se centrifugó a 1300 x g en un centrifugador Sorvall RT7 (Sorvall, Inc, Newtown, CT) a temperatura ambiente durante 20 minutos. La fase superior se transfirió a un tubo cónico nuevo y se añadió un mismo volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1). La mezcla se removió y centrifugó durante 10 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces de modo que se hicieron tres extracciones de fenol-cloroformo-isoamilalcohol. Luego, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un mismo volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1). La mezcla se removió otra vez y se centrifugada durante 10 minutos. Después del centrifugado, la fase acuosa (aproximadamente 5 ml) se transfirió a un tubo nuevo Oak Ridge y se añadieron 0,5 ml de 3 M de acetato sódico a pH 5.2 y 6,25 ml de isopropanol. La mezcla se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12.000 x g durante 30 minutos, a 4°C en un Sorvall RC5B (Sorvall, Inc, Newtown, CT). Tras el centrifugado, el sobrenadante se eliminó y 18 ml de etanol al 70% se añadieron cuidadosamente al granulado. Otra etapa de centrifugado se realizó durante 10 minutos a 4°C a 12.000 x g. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y el granulado se secó al aire. El granulado de ARN se resuspendió en 500 μ l de agua tratado con pirocarbonato dietilo (DEPC). Un calentamiento a 65°C durante 10 minutos ayudó en la resuspensión. El ARN total se almacenó a -80°C. La cuantificación y la evaluación de la calidad del ARN se hizo en un bioanalizador Agilent Bioanalyzer 2100 (Englewood, Co) usando trocitos de ARN. Todos los materiales y reactivos usados en este protocolo estaban libres de ribonucleasa.

ES 2 350 903 T3

Ejemplo 17

Clonación de secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de Aspergillus fumigatus

5 El ARN total descrito en el Ejemplo 16 se usó para clonar la secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID n°: 48 para la secuencia de ADNc y SEC ID n°: 49 para la secuencia de aminoácidos deducida). El ARNm del ARN total se purificó usando un Poly(A)Purist Mag Kit (Ambion, Inc., Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*, se amplificado después en dos fragmentos: un fragmento de ADN de 1,337 par de bases midiendo por palmos desde el codón de iniciación ATG hasta la posición 1,332 (marcado como fragmento 5') y un segundo fragmento de ADN de 1,300 par de bases (marcado como fragmento 3') midiendo por palmos desde la posición 1,303 hasta el codón de detención usando el sistema ProStar UltraHF RT- PCR System (Stratagene, La Jolla, CA), siguiendo el protocolo del fabricante para una reacción de 50 µl usando 200 ng de poly-A ARNm con los cebadores Afuma (sentido) y Afumc (antisentido) para el fragmento 5' y los cebadores Afumd (sentido) y Afumb (antisentido) para el fragmento 3' como se muestra
15 abajo:

Afuma: 5'-GGCTCATGAGATTCGGTTGGCTCGAGGTC-3' (SEC ID n°: 50)

Afumc: 5'-GCCGTTATCACAGCCGCGGTCGGGGCAGCC-3' (SEC ID n°: 51)

Afumd: 5'-GGCTGCCCGACCGCGGCTGTGATAACGGC-3' (SEC ID n°: 52)

Afumb: 5'-GCTTAATTAATCTAGTAGACACGGGGCAGAGGCGC-3' (SEC ID n°: 53)

25 El cebador Afuma tiene un sitio BspHI superior y el cebador Afumb tiene un sitio PacI inferior. Veinte nueve nucleótidos en el extremo 3' del fragmento 1,337 se solaparon con el extremo 5' del fragmento 1,303. En la región de recubrimiento sólo había un único sitio SacII.

30 Ambos fragmentos se subclonaron individualmente en el vector PCR-BluntII-TOPO usando un equipo Zero Blunt™ TOPO PCR Cloning Kit para la secuenciación, siguiendo el protocolo del fabricante, la generación de los plásmidos pCR4Blunt-TOPOAfcDNA5' (Figura 17) y pCR4Blunt-TOPOAfcDNA3' (Figura 18), conteniendo los fragmentos 5' y 3', respectivamente.

35 La región de codificación entera de ambos fragmentos de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* se confirmó mediante secuenciación usando 0,5 µl de cada ADN plásmido y 3,2 pmol de los siguientes cebadores:

BGLU1.dir: 5'-ACACTGGCGGAGAAGG-3' (SEC ID n°: 54)

BGLU2.dir: 5'-GCCCAGGGATATGGTTAC-3' (SEC ID n°: 55)

BGLU3.dir: 5'-CGACTCTGGAGAGGGTTTC-3' (SEC ID n°: 56)

BGLU4.inv: 5'-GGACTGGGTCATCACAAAG -3' (SEC ID n°: 57)

BGLU5.inv: 5'-GCGAGAGGTCATCAGCA -3' (SEC ID n°: 58)

M13 directo: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (SEC ID n°: 59)

M13 inverso: 5'-CAGGAAACAGCTATGA-3' (SEC ID n°: 60)

55 Los resultados de la secuenciación indicaron la presencia de diferentes cambios de nucleótidos al comparar la secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* obtenida con la secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* deducida de los datos de genoma de The Institute for Genomic Research (Instituto para investigación genómica) (Rockville, MD). En la posición 500, T se sustituyó por C, de modo que la secuencia codificante GTT se cambió a GCT, de modo que la valina se sustituyó por alanina. En la posición 903, T se sustituyó por C, de modo que la secuencia codificante CCC se cambió a CCT, no obstante, este cambio fue silencioso. En la posición 2,191, G se sustituyó por C, de modo que la secuencia codificante CAG se cambió por GAG, de modo que el ácido glutámico se sustituyó por glutamina. Finalmente, en la posición 2.368, C se sustituyó por T, de modo que la secuencia codificante CTG se cambió a TTG, no obstante, este cambio también fue silencioso.

65 Una vez se habían secuenciado los dos fragmentos, ambos clones conteniendo cada fragmento se digirieron usando aproximadamente 9 µg de cada ADN plásmido con SacII y PmeI. La digestión del vector pCR4Blunt-TOPOAfcDNA5' con las enzimas anteriores generó un fragmento de 3,956 par de bases (conteniendo la mayor parte del vector) y un segundo fragmento de y 1,339 par de bases (conteniendo el fragmento 5' del ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*). La digestión del vector pCR4Blunt-TOPOAfcDNA3' con estas mismas enzimas generó un fragmento de

ES 2 350 903 T3

5.227 par de bases (conteniendo la mayor parte del Vector pCR4Blunt- TOPO y el fragmento 3' del ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*) y un segundo fragmento de 31 par de bases.

El vector pCR4Blunt-TOPOAfcDNA3' digerido se trató con fosfatasa alcalina de gamba para la defosforilación de los productos de ADN digeridos añadiendo 1X de tampón SAP y 1 μ l de fosfatasa alcalina de gamba (Roche Applied Science, Manheim, Alemania) e incubando la reacción durante 10 minutos a 37°C seguido de una incubación a 85°C durante 10 minutos para la inactivación enzimática. Ambas digestiones se llevaron a cabo en un 0,7% gel de agarosa con tampón TAE y se purificaron usando un QIAGEN Gel Purification Kit según las instrucciones del fabricante. La banda de 1,339 par de bases generada a partir de la digestión de pCR4Blunt-TOPOAfcDNA5' y el fragmento de 5,527 par de bases generado a partir de la digestión de pCR4Blunt-TOPOAfcDNA3' se ligaron usando el Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Manheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se transformó en células competentes para la subclonación de *E. coli* XL1-Blue según las instrucciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA). Tras la transformación, ADN plásmido de una colonia aislada se secuenció para confirmar que tanto el fragmento 5' como el 3' del ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* se subclonaron en serie generando un vector pCR4Blunt-TOPOAfcDNA de 6,566 par de bases (Figura 19).

Ejemplo 18

20 *Construcción de los vectores de expresión de Saccharomyces cerevisiae pALFd6 y pALFd7*

El ADNc en su longitud total de la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* se amplificó por PCR usando los cebadores siguientes los cuales tienen homología a pCu426 y a las secuencias 5' y 3' del ADNc de la beta-glucosidasa *Aspergillus fumigatus*:

AfumigatusBGUpper:

5'-CTTCTGTAGTGCAATATCATATAGAAGTCATCGACTAGTGGATCTACCATGAGATTCGGTT

GGCTCG-3' (SEQ ID NO: 61)

ATGAGATTCGGTTGGCTCG tiene homología con el extremo 5' del ADNc de *Aspergillus fumigatus*

AfumigatusBGLower:

5'-GCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGCTAGTAGACACGGGGCAGAG-3'
(SEC ID n°: 62)

CTAGTAGACACGGGGCAGAG tiene homología al extremo 3' del ADNc de *Aspergillus fumigatus*

La reacción de amplificación (100 μ l) estaba compuesta por 0,5 μ l del plásmido pCR4Blunt-TOPOAfcDNA conteniendo la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus*, 1X de tampón de amplificación Pfx, 50 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 50 pmole de cada uno de los cebadores de arriba, 1,5 mM de MgSO₄, y 2,5 unidades de ADN polimerasa de Pfx Platinum. Las reacciones se incubaron en un RoboCycler Gradient 40 programado para 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto; y 72°C durante 3 minutos; y un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos. La reacción de PCR se purificó usando un QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). El ADN se eluyó en 30 μ l de tampón EB (QIAGEN Inc., Valencia, CA). El producto de PCR comprendía 37 par de bases de secuencia de ADN homóloga la cual se mezcló con 1 μ l de pCu426 adicionado con SpeI y XhoI para la cotransformación en células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 como se describe en el Ejemplo 10. Estas colonias no se volvieron azules, sugiriendo algún error de secuenciación en la secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. Otro secuenciación de la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus* indicó una inserción de un nucleótido extra en la secuencia de ADNc, la cual interrumpido el marco de lectura abierto de la enzima. Por lo tanto, este constructo debía de fijarse.

Simultáneamente a la expresión del ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* en *Saccharomyces cerevisiae*, la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* se cambió por la secuencia señal nativa de la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus* también para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* para comparar la expresión de las enzimas con ambas secuencias de señal. La secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus* se amplificó por PCR con un cebador el cual tiene homología a la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* en pALFd1 así como homología al extremo 5' de la secuencia de ADNc madura de la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. Los cebadores usados para la amplificación de la secuencia de ADNc de la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* son el cebador AfumigatusBGLower descrito antes y el cebador HiEGVAfumigatus descrito abajo:

ES 2 350 903 T3

HiEGVafumigatus:

5'-CCGCTCCGCCGTTGTGGCCGCCCTGCCGGTGTGGCCCTTGCCGAATTGGCTTTCTCTCC-3'
(SEC ID n°: 63)

5

GAATTGGCTTTCTCTCC tiene homología al extremo 5' de la secuencia madura de *Aspergillus fumigatus*.

La reacción de amplificación (100 μ l) estaba compuesta por 0,5 μ l del plásmido pCR4Blunt-TOPOAfcDNA conteniendo la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus*, 1X de tampón de amplificación Pfx, 50 μ M de cada uno de DATP, DCTP, DGTP, y dTTP, 50 pmole de cada uno de los cebadores de arriba, 1,5 mM de MgSO₄, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx Platino. Las reacciones se incubaron en un RoboCycler Gradient 40 programado para 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto; y 72°C durante 3 minutos; y un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos. La reacción de PCR se purificó usando un QIAquick PCR Purification Kit.

El ADN se eluyó en 10 μ l de tampón EB. Tres μ l del producto de PCR limpio se mezclaron con 1,8 μ l de pALFd61 adicionados con ECO NI y XhoI para la cotransformación en células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 como se describe en el Ejemplo 10. Estas colonias se volvieron de un color azul claro. No obstante, una colonia sobresalió siendo muy azul. La recogida de ADN de esta colonia se hizo según el protocolo descrito por Kaiser y Auer, 1993, BioTechniques 14: 552, excepto porque se usaron 20 μ l de tampón de lisis de levadura (1% de SDS, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA a pH 8), y el plásmido se transformó en células competentes para la electroporación SURE de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) para la secuenciación. La secuenciación en toda su longitud indicó que la secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* era correcta. Este plásmido se designó como pALFd7 (Figura 20), el cual comprendía la secuencia de ADNc de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* con la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* para la expresión de la levadura.

Para producir un vector de expresión de levadura conteniendo la secuencia de ADNc correcta de *Aspergillus fumigatus* con su secuencia señal nativa, la región conteniendo la secuencia de nucleótidos correcta a partir del vector de expresión de levadura conteniendo la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus* con la secuencia señal de la endoglucanasa V de *Humicola insolens* (pALFd7) se amplificó por PCR usando el cebador BGLU.5inv de arriba y el siguiente cebador:

BGL.7dir: 5'-CTGGCGTTGGCGCTGTC-3' (SEC ID n°: 64)

35

La reacción de amplificación (100 μ l) estaba compuesto por 0,5 μ l de pALFd7, 1X de tampón de amplificación Pfx, 50 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 50 pmole de cada uno de los cebadores de arriba, 1,5 mM de MgSO₄, y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfx Platino. Las reacciones se incubaron en un RoboCycler Gradient 40 programado para 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto; y 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de PCR de 701 par de bases se purificó usando un QIAquick PCR Purification Kit. El ADN se eluyó en 10 μ l de tampón EB. Tres μ l del producto de PCR limpio se mezclaron con 3 μ l del vector de expresión de levadura conteniendo la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus* con la secuencia señal nativa y el nucleótido extra adicionado con los vectores SacII y XmaI para la cotransformación en células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 como se describe en el Ejemplo 10. Estas colonias se volvieron azules. La recogida de ADN de una colonia azul escogida de forma aleatoria se hizo como se dice arriba, el plásmido se transformó en células competentes para la electroporación SURE de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) para la secuenciación. La secuenciación en toda su longitud indicó que la secuencia de ADNc de la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* era correcta. Este vector de expresión de levadura se designó pALFd6 (Figura 21), el cual comprendía la secuencia de ADNc de *Aspergillus fumigatus* con su secuencia señal nativa.

55 Ejemplo 19

Expresión de la beta-glucosidasa de Aspergillus fumigatus comparando la señal de secreción nativa y heteróloga en Saccharomyces cerevisiae

60 Los plásmidos pALFd6 (conteniendo el *Aspergillus fumigatus* con su secuencia señal nativa) y pALFd7 (conteniendo el *Aspergillus fumigatus* con la secuencia señal heteróloga), aproximadamente 1 μ g, se transformaron individualmente células competentes recién creadas de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318, se colocaron en placas de selección de levaduras, y se incubaron a 30°C durante 4 días como se describe en el Ejemplo 10.

65 Dos colonias azules de ambos constructos se escogieron manualmente y se inocularon en medio de selección de levadura (el cual contiene cobre) para inducir la expresión y la secreción de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. El caldo de cultivo del día 5 se sometió después a ensayo por duplicado para observar la actividad beta-glucosidasa usando p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosida como sustrato como se ha descrito anteriormente. Los cultivos expresando

ES 2 350 903 T3

beta-glucosidasa con la secuencia señal heteróloga produjo 2,5 veces más beta-glucosidasa que los cultivos expresando beta-glucosidasa con su secuencia señal nativa.

5 Depósito de material biológico

El siguiente material biológico se ha depositado según las condiciones del Tratado de Budapest con el Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, y se le dio el siguiente número de accesión:

10

Depósito	Nº de Accesión	Fecha de Depósito
<i>E. coli</i> TOP10 (pEJG113)	NRRL B-30695	17 de Octubre de 2003

15

La cepa se ha depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante el pendencia de esta solicitud de patente para alguien determinado por el Comisario de Patentes y Marcas Registradas para tener derecho a la misma bajo 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo substancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según se requiera por leyes de patentes extranjeras en países donde están depositados duplicados de la solicitud sujeta, o sus descendientes. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención sujeta en derogación de los derechos de patentes garantizados por la acción gubernamental.

25

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

30

Documentos de patente citados en la descripción

- DE AC3698GO10337 [0001]
- WO 9707205 A [0083]
- WO 9117243 A [0007]
- US 6461837 B [0102]
- WO 9600787 A [0047] [0082]
- US 5763254 A [0110]
- WO 9533836 A [0058]
- WO 9800529 A [0110]
- WO 0024883 A [0069] [0069]
- WO 2002095014 A [0131] [0155]
- WO 9726330 A [0080]
- WO 10375204 A [0193]
- EP 238023 A [0082]
- WO 60467766 A [0193]

45

Bibliografía fuera de la patente citada en la descripción

- Protein Purification VCH Publishers, 1989. [0016]
- **Higgins**. *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0022] [0170]
- **H. Neurath R.L. Hill**. *The Proteins Academic Press* 1979. [0033]
- **Innis et al**. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. *Academic Press*, 1990. [0039]
- **Romanos et al**. *Yeast*, 1992, vol. 8, 423-488 [0048]
- **Guo; Sherman**. *Molecular Cellular Biology*, 1995, vol. 15, 5983-5990 [0057]
- **Ehrlich**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1978, vol. 75, 1433- [0068]
- **Gems et al**. *Gene*, 1991, vol. 98, 61-67 [0069]
- **Cullen et al**. *Nucleic Acids Research*, 1987, vol. 15, 9163-9175 [0069]

65

ES 2 350 903 T3

- **Hawksworth** *et al.* Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi CAB International, *University Press*, 1995.
- Biology and Activities of Yeast Biology and Activities of Yeast *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series*, 1980.
- 5 • **Yoder; Christianson.** *Fungal Genetics and Biology*, 1998, vol. 23, 62-80 [0080]
- **O'Donnell** *et al.* *Fungal Genetics and Biology*, 1998, vol. 23, 57-67 [0080]
- **Yelton** *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0082]
- 10 • **Penttila** *et al.* *Gene*, 1987, vol. 61, 155-164 [0082]
- **Gruber** *et al.* *Curr Genet.*, 1990, vol. 18, no. 1. 71-6 [0082]
- 15 • **Malardier** *et al.* *Gene*, 1989, vol. 78, 147-156 [0082]
- Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology Methods in Enzymology *Academic Press, Inc.* vol. 194, 182-187
- 20 • **Ito** *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1983, vol. 153, 163 [0082]
- **Hinnen** *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1978, vol. 75, 1920 [0082]
- **Montenecourt; Eveleigh.** *Adv. Chem. Ser.*, 1979, vol. 181, 289-301 [0083]
- 25 • **Mandels; Reese.** *J. Bacteriol.*, 1957, vol. 73, 269-278 [0083]
- **Giesecke** *et al.* *Journal of Virol. Methods*, 1992, vol. 38, 47-60 [0101]
- 30 • **Horton** *et al.* *Gene*, 1989, vol. 77, 61-68 [0114]
- **Mandel; Higa** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 45, 154 [0115]
- **Sambrook** *et al.* *Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989. [0115]
- 35 • **Labbe; Thiele** *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 306, 145-53 [0157]
- **Altschul** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0163]
- 40 • **Nielsen** *et al.* *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1-6 [0169]
- **Christensen** *et al.* *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1419-1422 [0171]
- 45 • **Kaiser; Auer** *BioTechniques*, 1993, vol. 14, 552 [0185]

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un polipéptido segregado, comprendiendo:

(a) cultivar una célula huésped fúngica en un medio propicio para la producción del polipéptido, donde la célula huésped fúngica comprende un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una primera secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal operativamente enlazado a una segunda secuencia de nucleótidos codificando el polipéptido, donde la primera secuencia de nucleótidos es ajena a la segunda secuencia de nucleótidos, el extremo 3' de la primera secuencia de nucleótidos está inmediatamente corriente arriba del codón iniciador de la segunda secuencia de nucleótidos, y la primera secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37;

(ii) una secuencia de nucleótidos codificando un péptido señal comprendiendo una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 90% de identidad con la SEC ID n°: 37, y codificando una variante del péptido señal con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37 comprendiendo una sustitución o delección de uno o más aminoácidos que no afectan significativamente a la actividad del péptido señal; y

(b) aislar el polipéptido segregado a partir del medio de cultivo.

2. Método según la reivindicación 1, donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un péptido señal que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 37, o un fragmento peptídico de la misma que retiene la capacidad para dirigir el polipéptido dentro de una vía secretora de la célula.

3. Método según la reivindicación 1, donde la primera secuencia de nucleótidos consiste en la SEC ID n°: 36, o una subsecuencia de la misma la cual codifica un péptido señal que retiene la capacidad para dirigir el polipéptido dentro de una vía secretora de la célula.

4. Método según la reivindicación 1, donde la primera secuencia de nucleótidos está contenida en un gen de endoglucanasa V el cual está contenido en la cepa DSM 1800 de *Humicola insolens*.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido heterólogo o nativo a la célula huésped fúngica.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la célula huésped fúngica contiene una o más copias de la segunda secuencia de nucleótidos.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el polipéptido es una hormona o variante de hormona, enzima, receptor o parte del mismo, anticuerpo o parte del mismo, o indicador.

8. Método según la reivindicación 7, donde la enzima es una oxidorreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, o ligasa.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la enzima es una endoglucanasa, celobiohidrolasa, o beta-glucosidasa.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el polipéptido es una beta-glucosidasa.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa o de levadura.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el constructo de ácidos nucleicos comprende además un promotor operativamente enlazado a las secuencias de nucleótidos primera y segunda.

13. Método según la reivindicación 12, donde el promotor se selecciona a partir del grupo que consiste en un promotor del gen de celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, promotor del gen de celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, promotor del gen de xilanasa I de *Trichoderma reesei*, promotor del gen de xilanasa II de *Trichoderma reesei*, y promotor del gen de beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*.

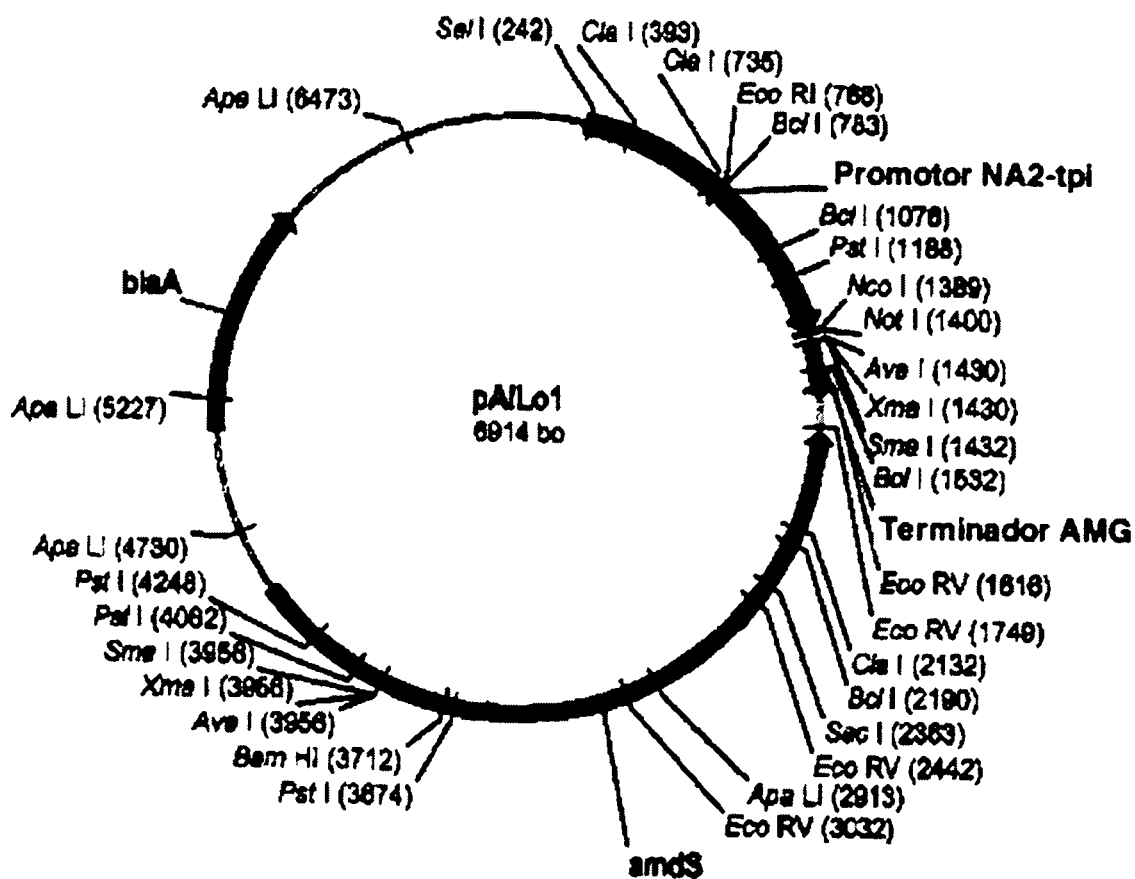


Fig. 1

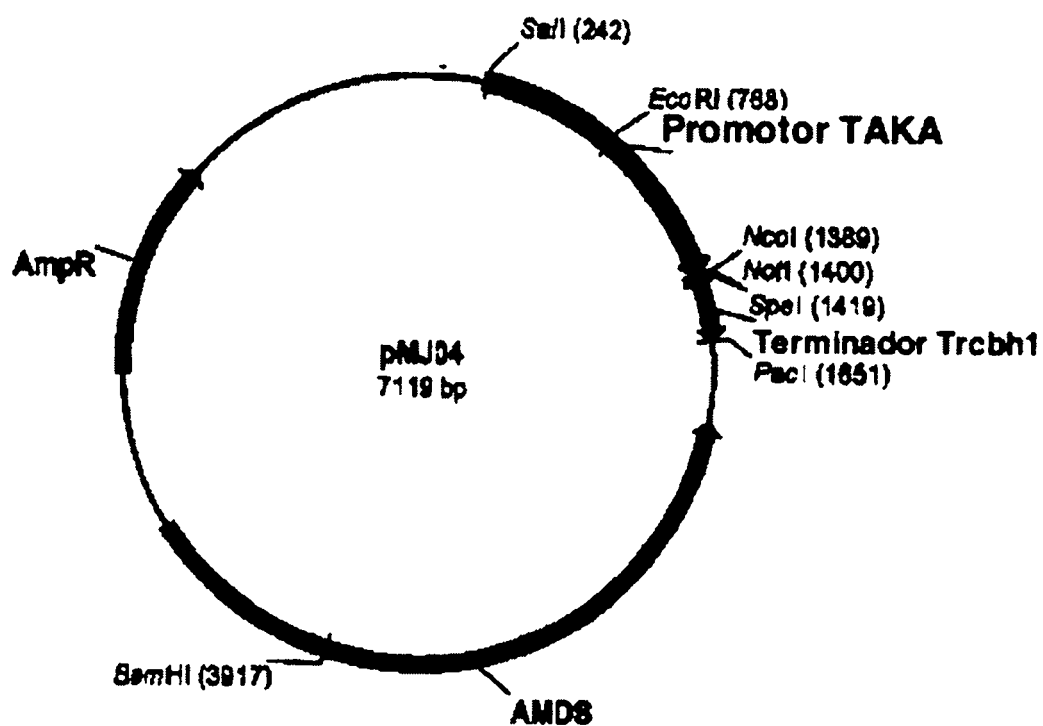


Fig. 2

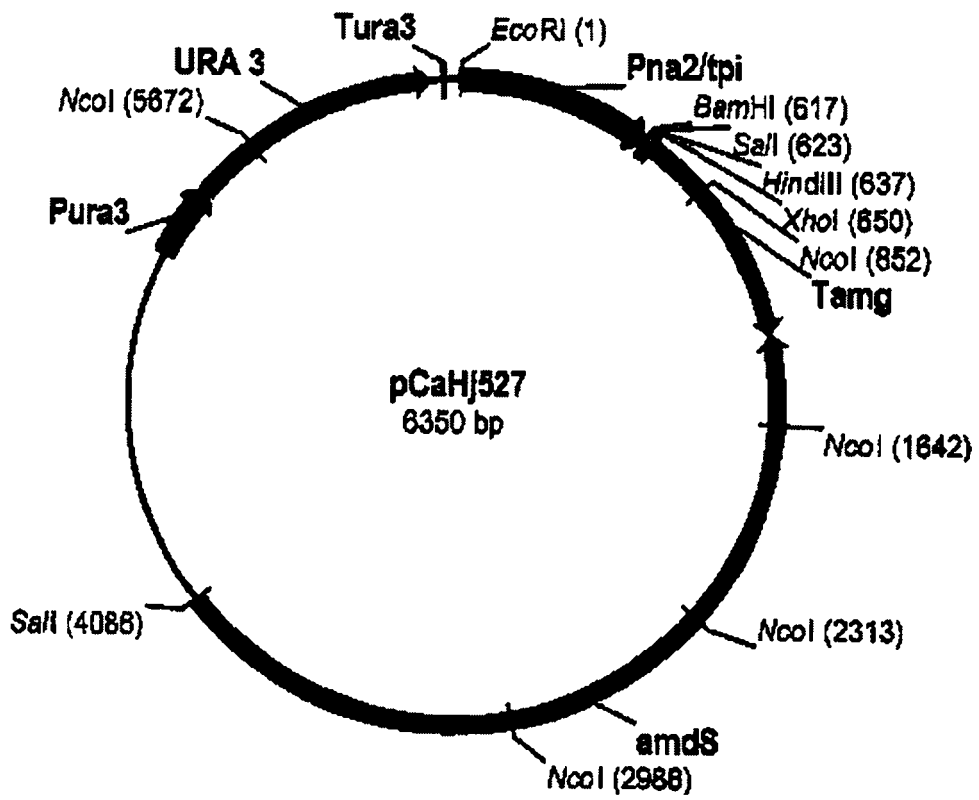


Fig. 3

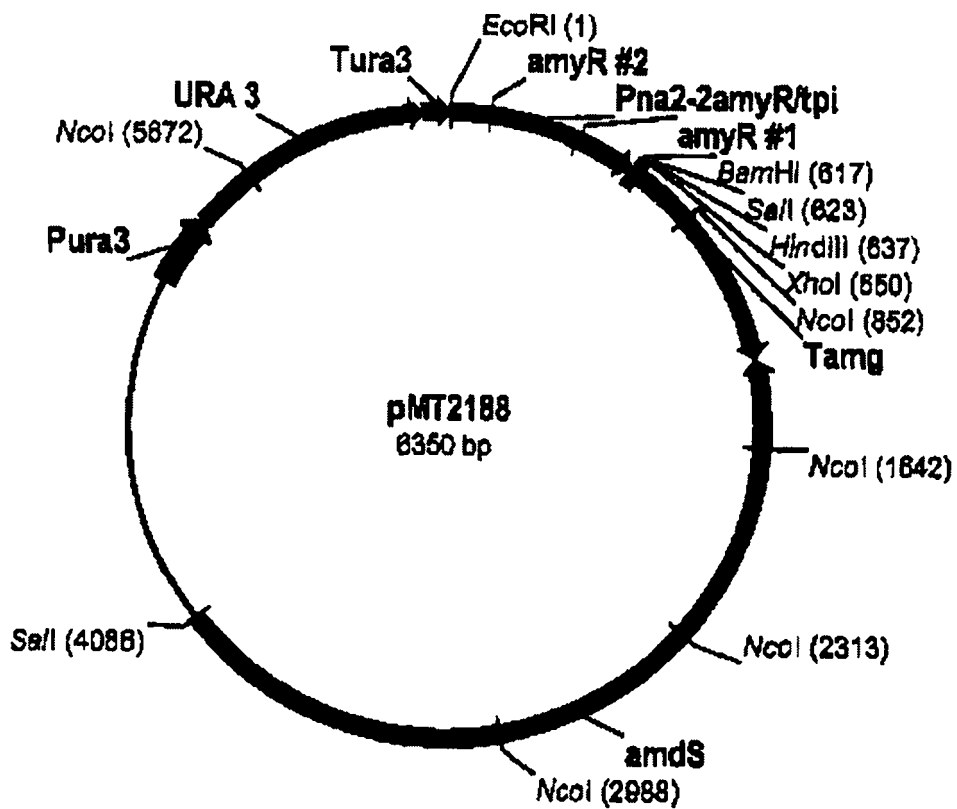


Fig. 4

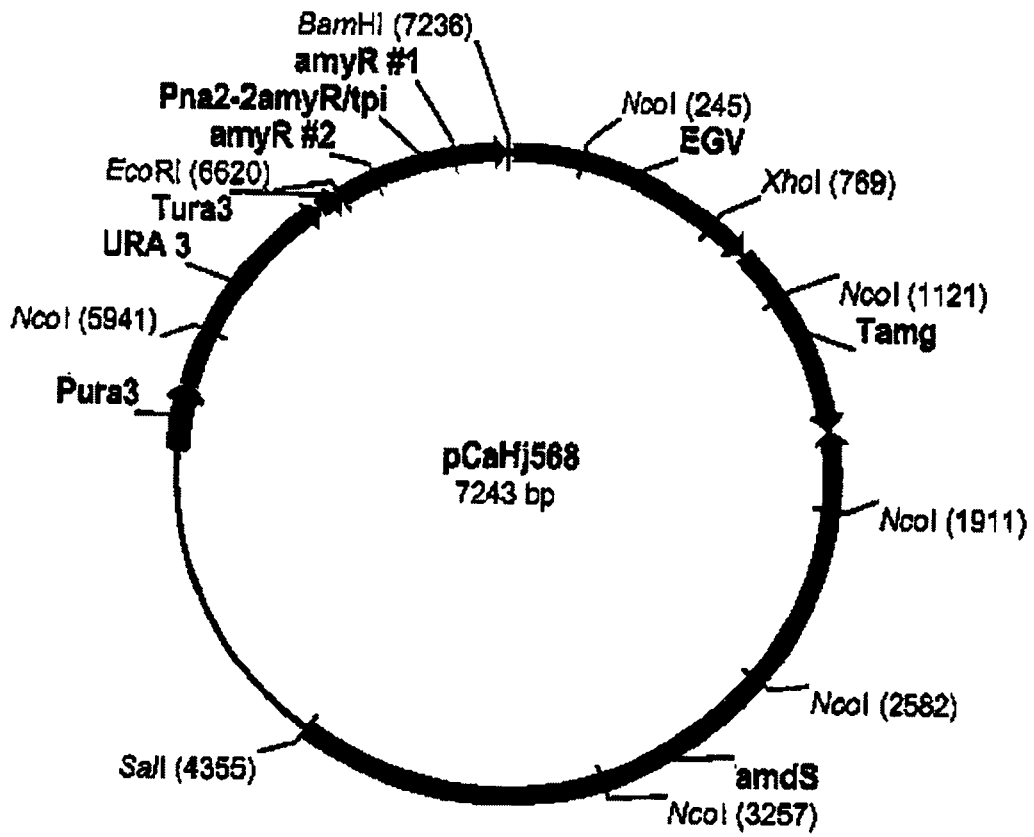


Fig. 5

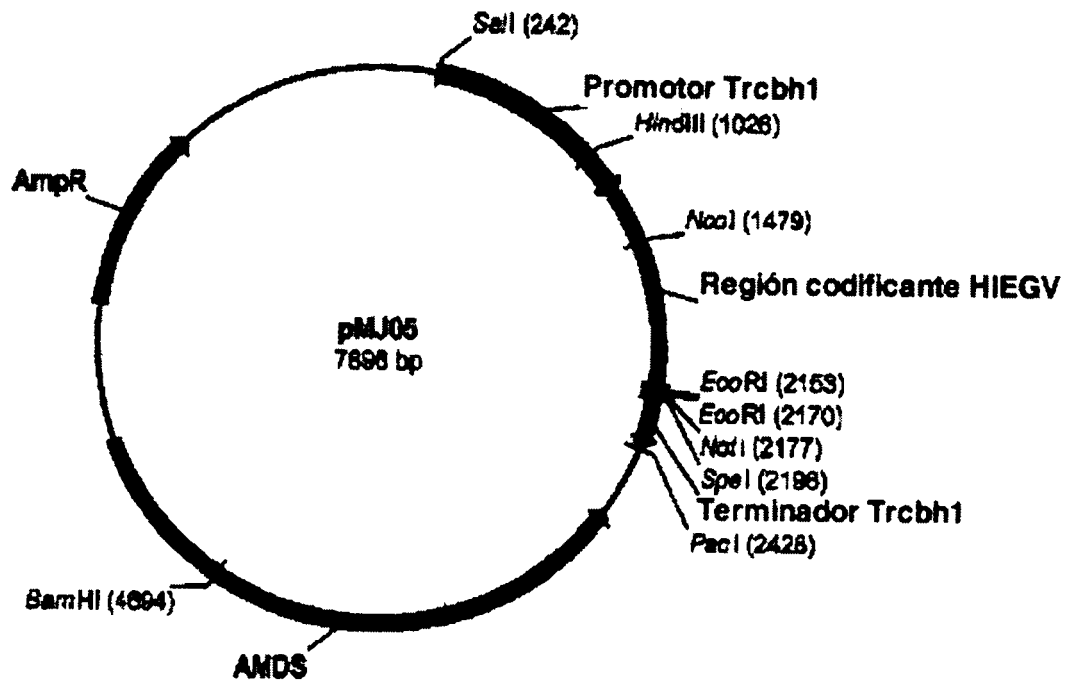


Fig. 6

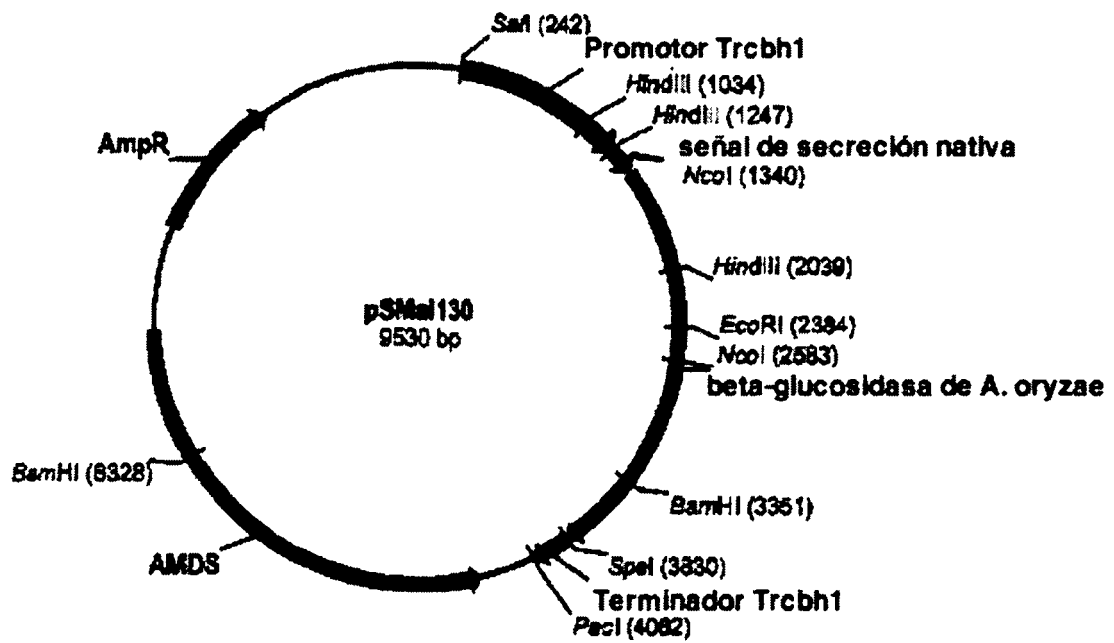


Fig. 7

ATG AAG CTT GGT TGG ATC GAG GTG GCC GCA TTG GCG GCT GCC TCA GTA GTC AGT GCC
M R L G W I E V A A L A A A S V V S A

Fig 8

ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CGC TCC GCC GGT GTG GCC GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC
M R S S S P L L L R R S A V V A A A L L P V L A L A

Fig. 9

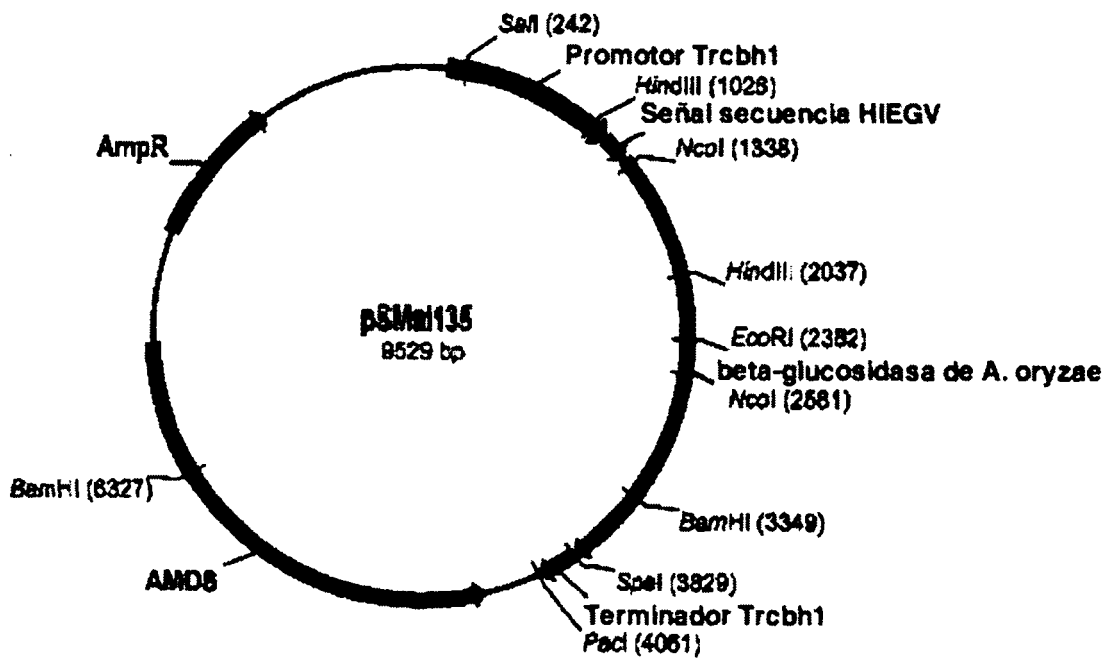


Fig. 10

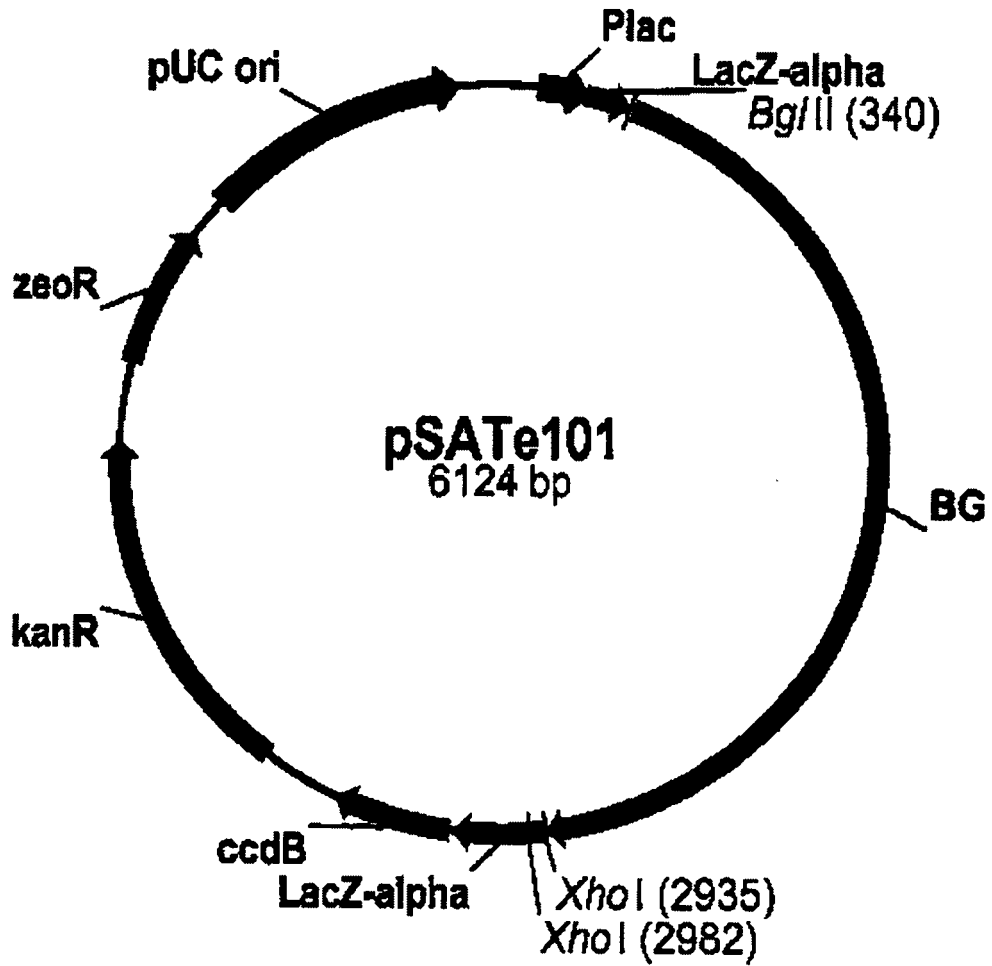


Fig. 11

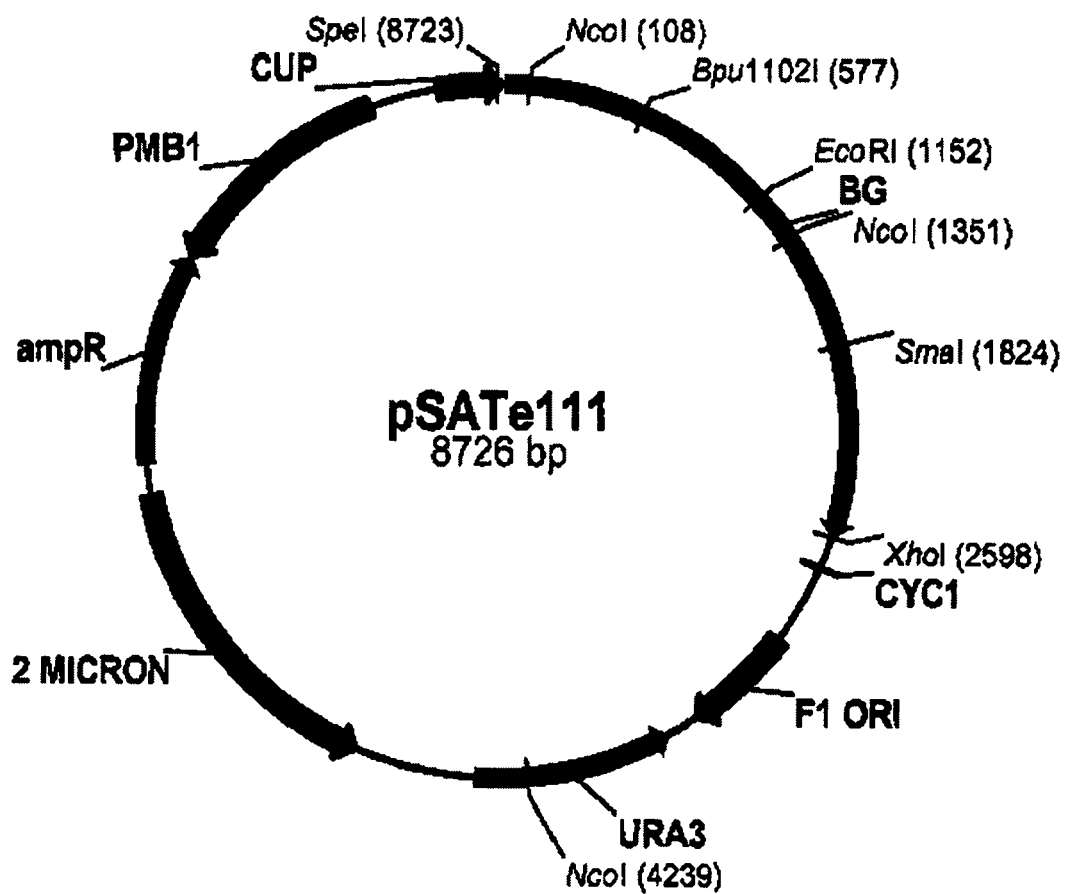


Fig. 12

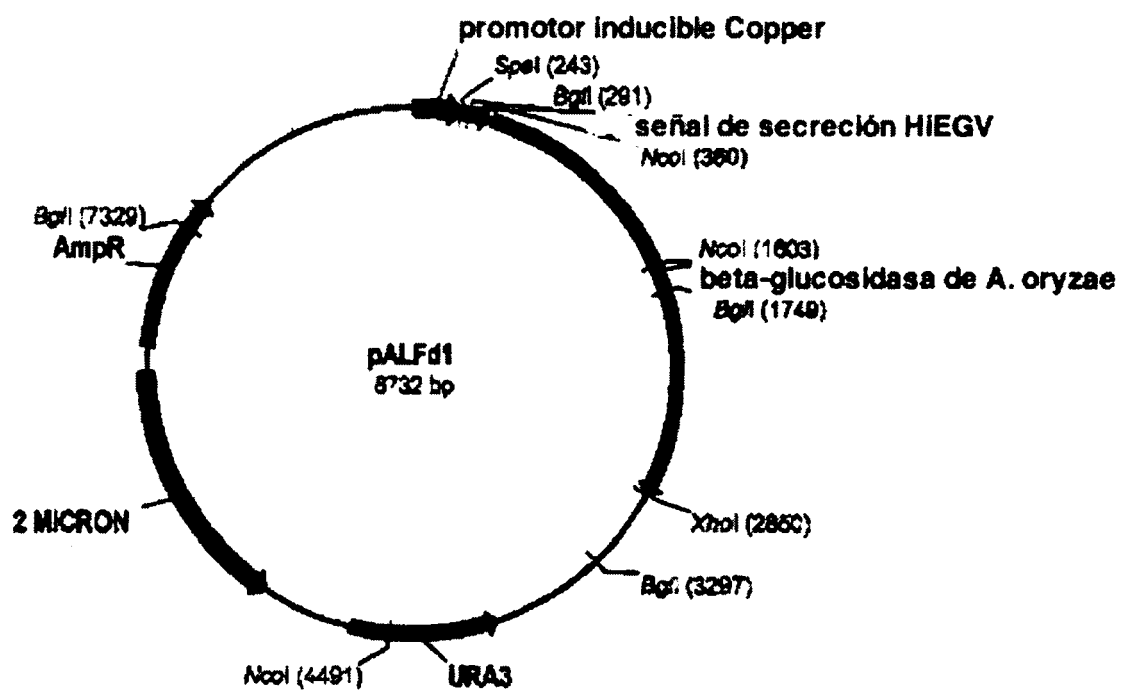


Fig. 13

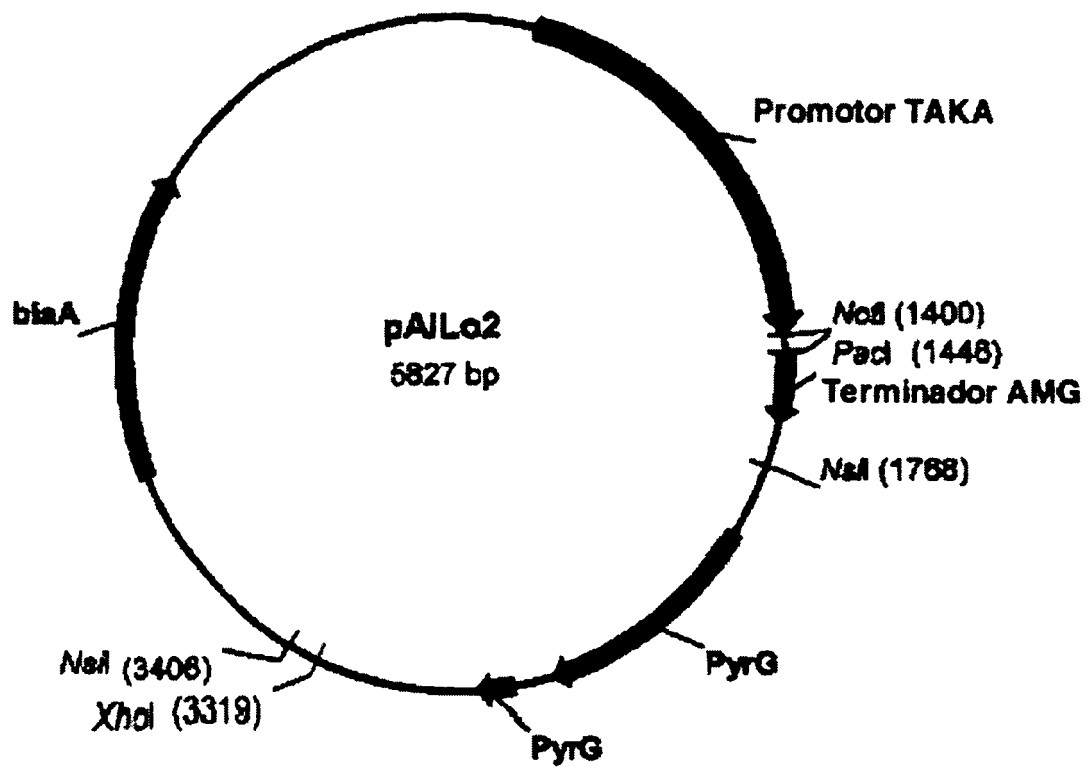


Fig. 14

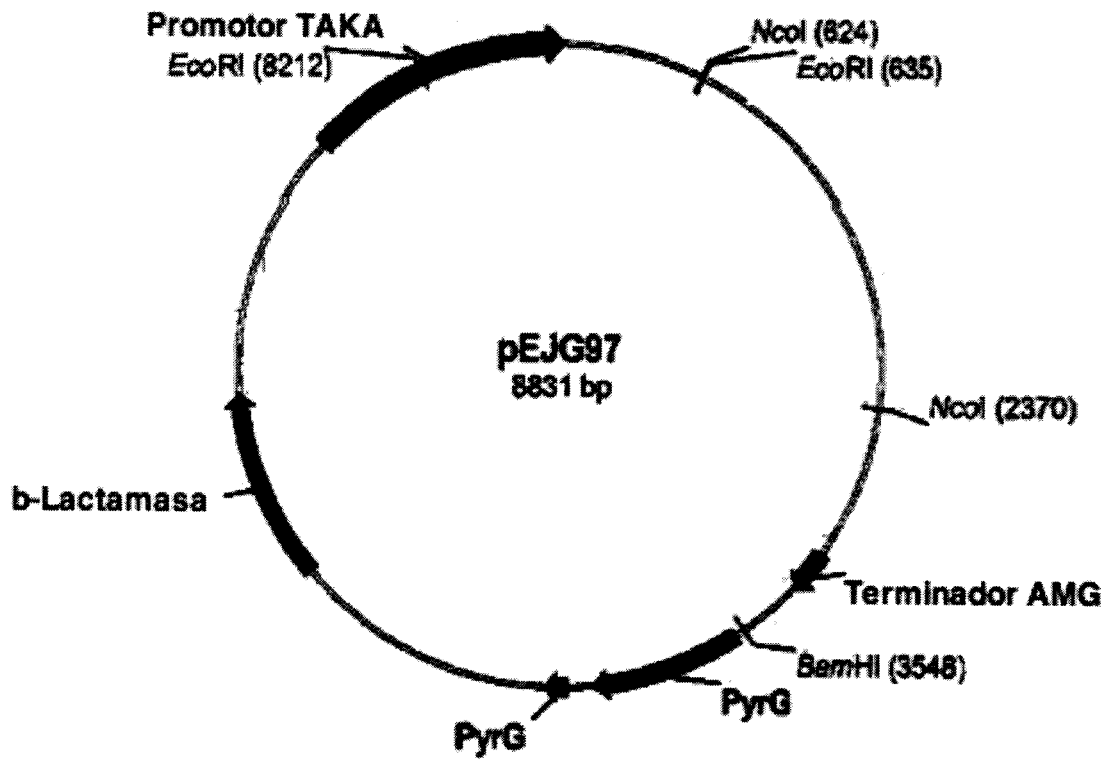


Fig. 15

GATACGGGCTCTCAGCCAGATGGCGMAGTGTTCATCTCAATCCAGGCTAGTCCGGGCTCTTAGAAAAGAACACCTTCTCTGAATGAAGTCTTTTAACCA 1900
 D M G A L S Q M A D V A S Q E S
 TTGCGAACAGCGTCTTTGGTGTTCACACCGCGACTCTGGAGAGGGTTTCATCAGTGTCCAGCGCACAGGGGTGACCGCAAAAATCTACCTCTGTG 2000
 V S L V F V N A D S G E G F I S V D G X H G D X K M L T L W
 GAAGACGGCGAGCGCTCATTGACACTGTTGTTCAGCCACTGCAACACACAGATTTGGTGTATTCACAGTGTGGCCCTCTGATCAGCCGGTGGTAT 2100
 X M G E A V I D T V V S H C M M T I V V I H E S V Q P V L I D R N Y
 GATACCCCAAGCTCACTGCCATCACTCCGGCCCGCTTSCCGGTCAGGAGYGGCACTCCCTGGTCCGACCTCTCTATGGCCGGTCAACCCAGCG 2200
 D M P N V T A I I W A G L P G Q E S G H S L V D V L Y G E R V M P S
 CCAGACCCCTTACCTGGGCGAGACTGGGNGTCTACGGGCTCCCTTGTCTACCGAGCTTAACAATGGCAATGGTGCCTCCCGAGGATGATTTCAA 2300
 A K T P F T M G K T R E S Y G A P L L T N P N H G M G A P O D D F M
 CGAGGCGTCTTCATGACTACCTGACTTTGACRANGCGCAATGAGACCCCCATTTAATGAGTTTGGCCATGGCTTGAGCTACACACCCTTTGGTTACTCT 2400
 E G V F I D Y R H F D K R M H T P I Y E F G M G L S Y T Y T F G Y S
 CACCCTCCGGTTCAGCCCTCAATAGTTCGAGTTCGGCATAATGTCCGACTAGCGGAGAGACCAAGCTGGCCCAACTATATGATGATGGTGGTGG 2500
 H L R V Q A L N S S A Y V P T B G H T K P A P T Y G X I G S A
 CCGACTACTGTATCCCGAGGCTCAARAGATTAACCAAGTTTATTEACCCCTTGGCTCAACTGACCGACTCCAGGATTTCTTGAAGACCCGAACTA 2600
 A D Y L X P E G L K R I T K F I Y P W L M S T D L E D S D D P N Y
 CGGTCGGAGACTCGGAGTACATCCCGAGCGGCTAGGAGTGTCTCTCAACCCCTCTGAGGCTGGCCCTCTCTGGTGTACCCCTACCCCTT 2700
 G W E D S E Y L P E G A E D G S P Q P L L K A G G A P G G E N P T L
 TATCAGGATCTTGTAGGGTCCGGCCACALAACCAACACTGGTAAAGTGGCGGTTATGAAGTCCCTCAATGTGGTGGAGTGACCCCGCATGTCTCTCCG 2800
 Y Q D L V R V S A T I T M T G M V A C Y E V P Q L
 TTGCAATTTGGCTAACCTGCTTAGTATGTTTACATGGGCGGACCGAAGCCCTGGGCTGCTTCCGCAAGTTCGACCGAATCTTCTGGCTCCG 2900
 Y V S L G G P M E F R V V L R K F D R I F L A P G
 CGAGCAAAAGGTTGGACCAAGCTCTTAAACCGTGTGATCTCCCAATTTGGATGTGGAGGCTCAGACTGGGTATCAACAAGTACCCCAAGARAGTG 3000
 E Q X V M F T T L M R E D L A N W D V X A Q D W V I T X Y P X K V
 CAGCTCCGACCTCTCCGTTAGCTGCCCTCTGAGAGGCGCTCTGCCCCGTTACTAG 3060
 H V G S S S E K L P L R A F L P E V Y .

Fig. 16B

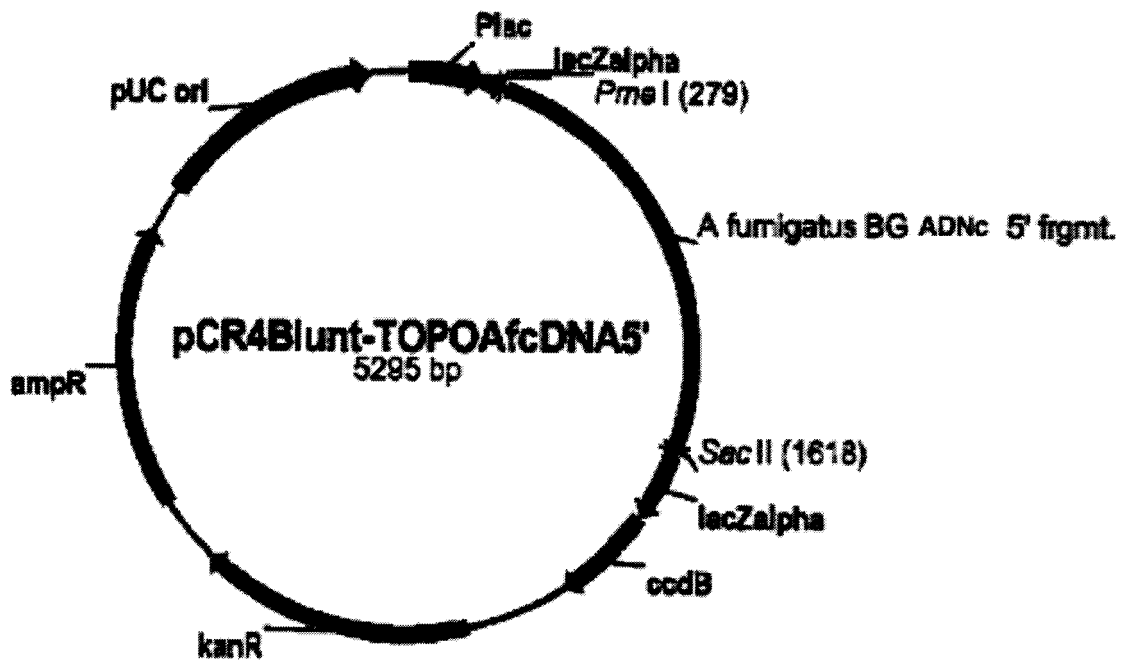


Fig. 17

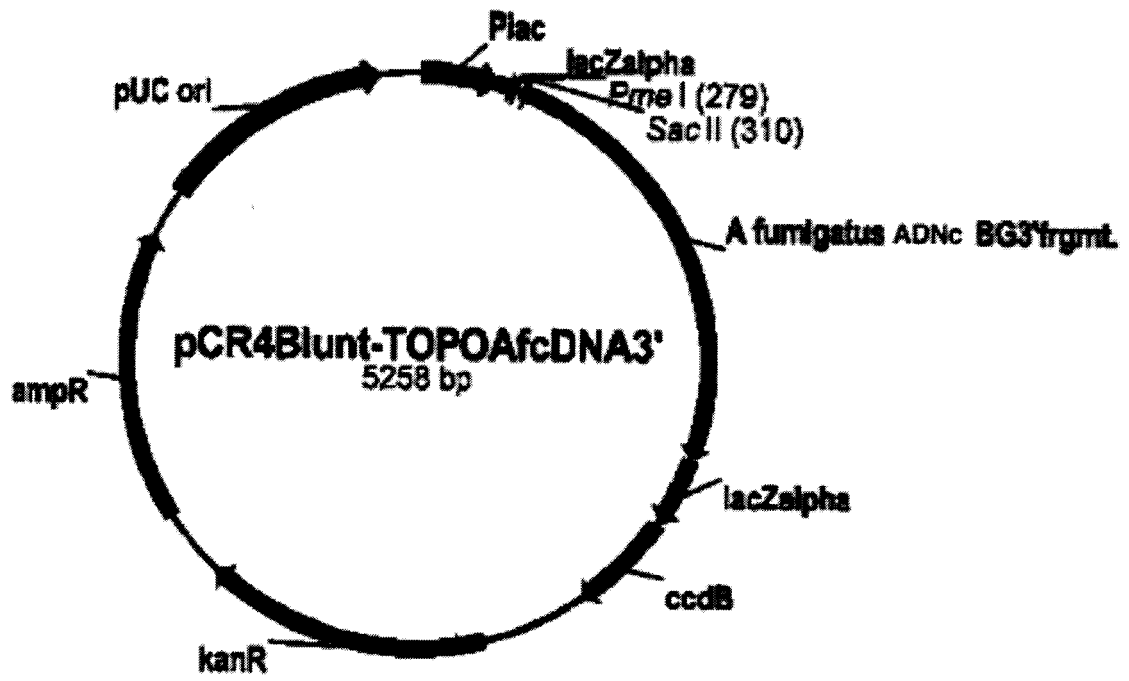


Fig. 18

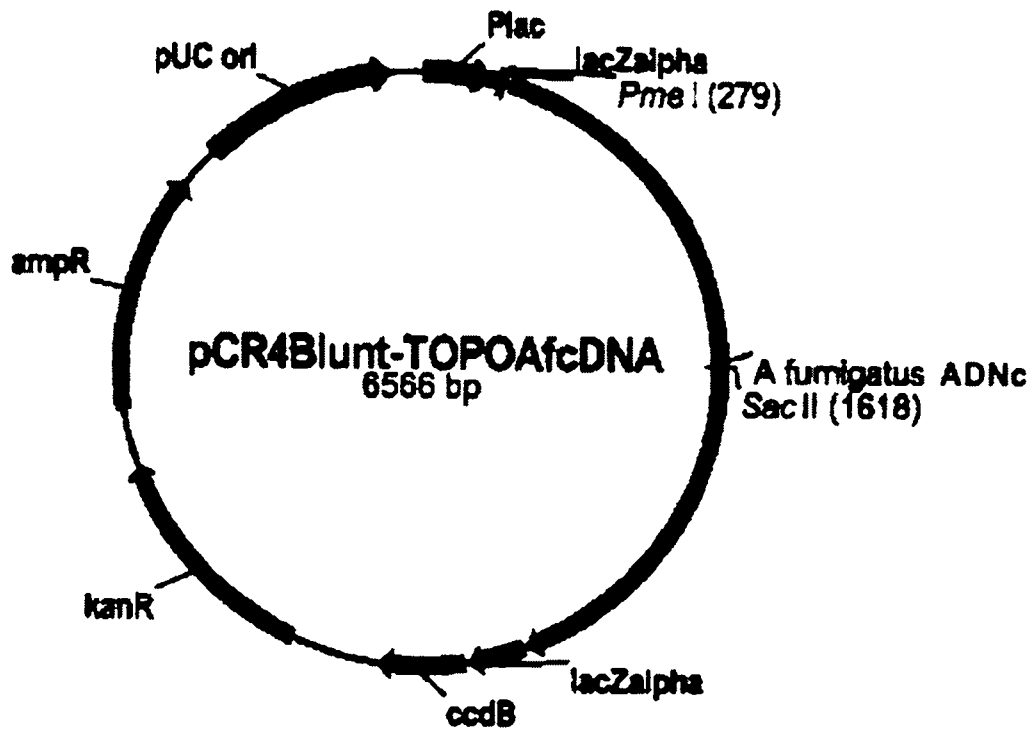


Fig. 19

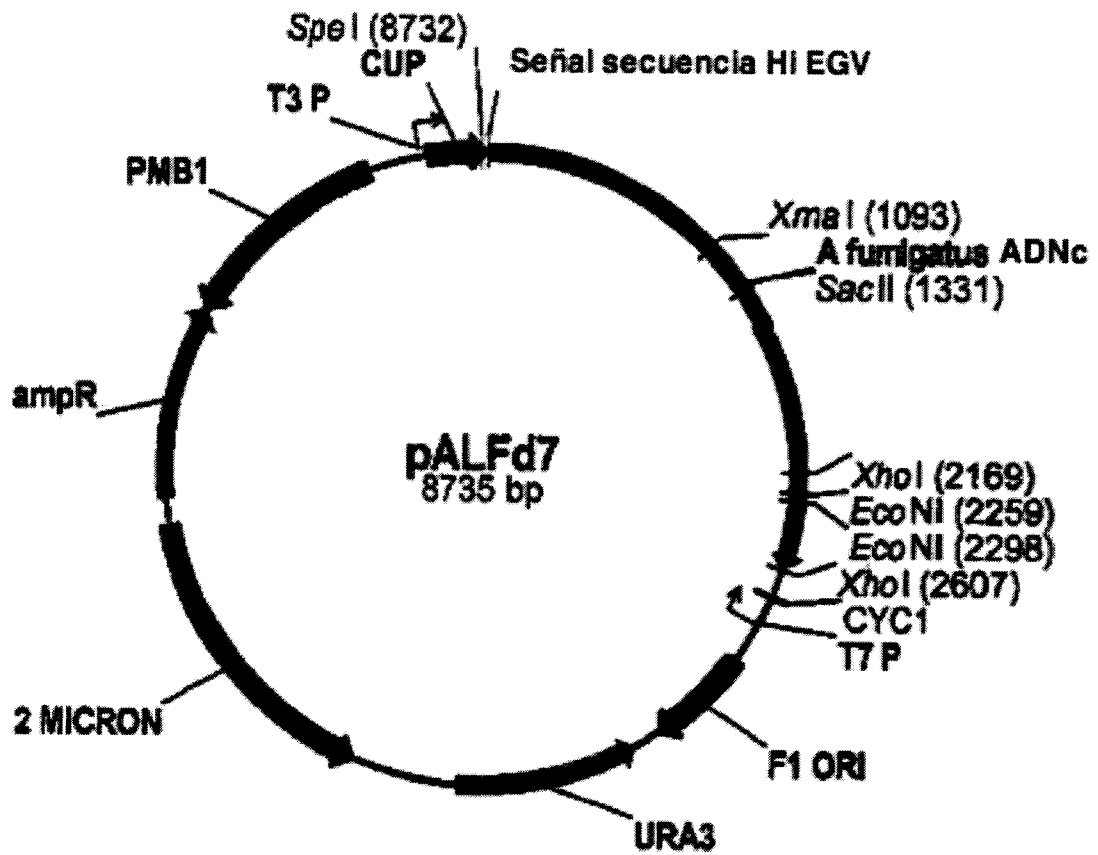


Fig. 20

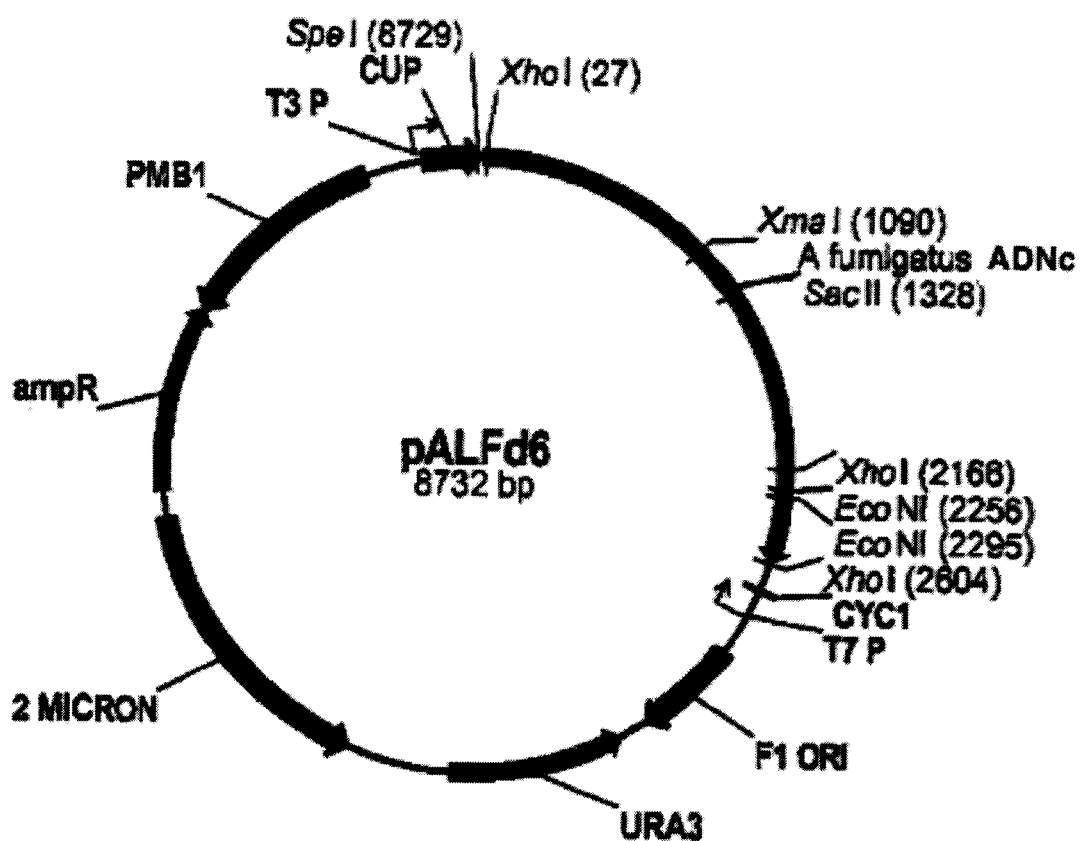


Fig. 21

ES 2 350 903 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> NOVOZYMES BIOTECH, INC. Maiyiran, Suchindra Fidantsef, Ana Brody, Howard	
	<120> Métodos para producir polipéptidos segregados	
10	<130> 10375.204-WO	
	<150> 60/467,766	
15	<151> 2003-05-02	
	<160> 64	
20	<170> Versión de patentIn 3.2	
	<210> 1	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 1	
30	gtgccccatg atacgcctcc gg	22
	<210> 2	
35	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
40	<400> 2	
	gagtcgtatt tccaaggctc ctgacc	26
45	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
50	<400> 3	
	ggaggccatg aagtggacca acgg	24
55	<210> 4	
	<211> 45	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Aspergillus niger</i>	
	<400> 4	
65	caccgtgaaa gccatgctct ttccttcgtg tagaagacca gacag	45

ES 2 350 903 T3

	<210> 5	
	<211> 45	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Aspergillus niger</i>	
	<400> 5	
10	ctggtcttct acacgaagga aagagcatgg ctttcacggt gtctg	45
	<210> 6	
	<211> 44	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 6	
20	ctatatacac aactggattt accatgggcc GATC de cgcggccgca	44
	<210> 7	
25	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
30	<400> 7	
	gatctcgggc cgcgggccca tggtaaatcc agttgtgtat atag	44
35	<210> 8	
	<211> 29	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 8	
45	aacgtaatt aaggaatcgt tttgtgtt	29
	<210> 9	
	<211> 29	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 9	
55	agtactagta gctcctggc gaaagcctg	29
	<210> 10	
60	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> <i>Humicola insolens</i>	
65	<400> 10	
	aatagattga de ttgaattgaa tttaaaactt C	31

ES 2 350 903 T3

	<code><210> 11</code>		
	<code><211> 25</code>		
	<code><212> ADN</code>		
5	<code><213> <i>Humicola insolens</i></code>		
	<code><400> 11</code>		
10	<code>ttgcatgctg aatcatggtc atagc</code>		25
	<code><210> 12</code>		
	<code><211> 26</code>		
15	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i></code>		
	<code><400> 12</code>		
20	<code>ttgaattcat ggtaataac tgatat</code>		26
	<code><210> 13</code>		
25	<code><211> 32</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i></code>		
30	<code><400> 13</code>		
	<code>aaatcaatct atttcaatt caattcatca tt</code>		32
35	<code><210> 14</code>		
	<code><211> 45</code>		
	<code><212> ADN</code>		
40	<code><213> <i>Aspergillus oryzae</i></code>		
	<code><400> 14</code>		
45	<code>ggatgctgtt gactccggaa atttaacggt ttggtcttgc atccc</code>		45
	<code><210> 15</code>		
	<code><211> 44</code>		
50	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> <i>Aspergillus oryzae</i></code>		
	<code><400> 15</code>		
55	<code>ggtattgtcc tgcagacggc aatttaacgg cttctcggaa tcgc</code>		44
	<code><210> 16</code>		
60	<code><211> 29</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> <i>Humicola insolens</i></code>		
65	<code><400> 16</code>		
	<code>aagcttaagc atgcgttctt cccccctcc</code>		29

ES 2 350 903 T3

	<i><210></i> 17	
	<i><211></i> 32	
	<i><212></i> ADN	
5	<i><213></i> <i>Humicola insolens</i>	
	<i><400></i> 17	
10	ctgcagaatt ctacaggcac tgatggtacc Ag	32
	<i><210></i> 18	
	<i><211></i> 32	
15	<i><212></i> ADN	
	<i><213></i> <i>Humicola insolens</i>	
	<i><400></i> 18	
20	ctgcagaatt ctacaggcac tgatggtacc Ag	32
	<i><210></i> 19	
25	<i><211></i> 36	
	<i><212></i> ADN	
	<i><213></i> <i>Humicola insolens</i>	
30	<i><400></i> 19	
	accgcgact gcgcatcatg cgttctctccc cctctc	36
35	<i><210></i> 20	
	<i><211></i> 29	
	<i><212></i> ADN	
40	<i><213></i> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<i><400></i> 20	
45	aaacgtcgac cgaatgtagg attgttatc	29
	<i><210></i> 21	
	<i><211></i> 17	
	<i><212></i> ADN	
50	<i><213></i> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<i><400></i> 21	
55	gatgcgcagt ccgcggt	17
	<i><210></i> 22	
60	<i><211></i> 29	
	<i><212></i> ADN	
	<i><213></i> <i>Trichoderma reesei</i>	
65	<i><400></i> 22	
	aaacgtcgac cgaatgtagg attgttatc	29

ES 2 350 903 T3

	<210> 23	
	<211> 36	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 23	
10	ggagggggga ggaacgcatg atgcgcagtc cgcggt	36
	<210> 24	
	<211> 29	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 24	
20	aaacgtcgac cgaatgtagg attgttatc	29
	<210> 25	
25	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
30	<400> 25	
	ctgcagaatt ctacaggcac tgatgtacc Ag	32
35	<210> 26	
	<211> 46	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 26	
45	atagtcaacc gcggactgcg catcatgaag cttggttga tcgagg	46
	<210> 27	
	<211> 26	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 27	
55	actagtttac tgggccttag gcagcg	26
	<210> 28	
60	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
65	<400> 28	
	gtcgactcga agcccgaatg taggat	26

ES 2 350 903 T3

	<210> 29	
	<211> 45	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 29	
10	cctcgatcca accaagcttc atgatgcgca gtccgcggtt gacta	45
	<210> 30	
	<211> 42	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 30	
20	tgccggtgtt ggcccttgcc aaggatgac tcgcgtactc cc	42
	<210> 31	
25	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
30	<400> 31	
	gactagtctt actggcctt aggcagcg	28
35	<210> 32	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 32	
45	acgcgtcgac cgaatgtagg attgttatcc	30
	<210> 33	
	<211> 42	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 33	
55	gggagtacgc gagatcatcc ttggcaaggg ccaacaccgg aprox	42
	<210> 34	
60	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
65	<400> 34	
	atgaagcttg ggtggccgca de gttgatcga ttggcggctg cctcagtagt cagtgcc	57

ES 2 350 903 T3

```

<400> 39
      gcctcagatt actgggcctt aggcagcgag
5
  <210> 40
  <211> 40
  <212> ADN
10 <213> Humicola insolens

  <400> 40

15      aatccgacta gtggatctac catgctgtcc tccccctcc
      <210> 41
      <211> 32
20 <212> ADN
      <213> Humicola insolens

  <400> 41
25      gcgggctcgc agttactggg ccttaggcag coriogonadotropina
      <210> 42
30 <211> 2586
      <212> ADN
      <213> Aspergillus oryzae

35 <220>
      <221> CDS
      <222> (1)..(2583)

40 <400> 42

      atg aag ctt ggt tgg atc gag gtg gcc gca ttg gcg gct gcc tca gta      48
      Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val
      1          5          10          15

      gtc agt gcc aag gat gat ctc gcg tac tcc cct cct ttc tac cct tcc      96
      Val Ser Ala Lys Asp Asp Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser
      20          25          30
50

55

60

65

```

ES 2 350 903 T3

	cca tgg gca gat ggt cag ggt gaa tgg gcg gaa gta tac aaa cgc gct	144
	Pro Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Glu Val Tyr Lys Arg Ala	
	35 40 45	
5	gta gac ata gtt tcc cag atg acg ttg aca gag aaa gtc aac tta aag	192
	Val Asp Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Thr Glu Lys Val Asn Leu Thr	
	50 55 60	
10	act gga aca gga tgg caa cta gag agg tgt gtt gga caa act ggc agt	240
	Thr Gly Thr Gly Trp Gln Leu Glu Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser	
	65 70 75 80	
15	gtt ccc aga ctc aac atc ccc agc ttg tgt ttg cag gat agt cct ctt	288
	Val Pro Arg Leu Asn Ile Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu	
	85 90 95	
20	ggc att cgt ttc tcc gac tac aat tca gct ttc cct gcg ggt gtt aat	336
	Gly Ile Arg Phe Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn	
	100 105 110	
25	gtc gct gcc acc tgg gac aag acg ctc gcc tac ctt cgt ggt cag gca	384
	Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Gln Ala	
	115 120 125	
30	atg ggt gag gag ttc agt gat aag ggt att gac gtt cag ctg ggt cct	432
	Met Gly Glu Glu Phe Ser Asp Lys Gly Ile Asp Val Gln Leu Gly Pro	
	130 135 140	
35	gct gct ggc cct ctc ggt gct cat ccg gat ggc ggt aga aac tgg gaa	480
	Ala Ala Gly Pro Leu Gly Ala His Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu	
	145 150 155 160	
40	ggc ttc tca cca gat cca gcc ctc acc ggt gta ctt ttt gcg gag acg	528
	Gly Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr	
	165 170 175	
45	att aag ggt att caa gat gct ggt gtc att gcg aca gct aag cat tat	576
	Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr	
	180 185 190	
50	atc atg aac gaa caa gag cat ttc cgc caa caa ccc gag gct gcg ggt	624
	Ile Met Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Gln Pro Glu Ala Ala Gly	
	195 200 205	
55	tac gga ttc aac gta agc gac agt ttg agt tcc aac gtt gat gac aag	672
	Tyr Gly Phe Asn Val Ser Asp Ser Leu Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys	
	210 215 220	
60	act atg cat gaa ttg tac ctc tgg ccc ttc gcg gat gca gta cgc gct	720
	Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala	
	225 230 235 240	
65	gga gtc ggt gct gtc atg tgc tct tac aac caa atc aac aac agc tac	768
	Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr	
	245 250 255	
70	ggc tgc gag aat agc gaa act ctg aac aag ctt ttg aag gog gag ctt	816
	Gly Cys Glu Asn Ser Glu Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu	
	260 265 270	

ES 2 350 903 T3

5 ggt ttc caa ggc ttc gtc atg agt gat tgg acc gct cat cac agc ggc 864
 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Thr Ala His His Ser Gly
 275 280 285

10 gta ggc gct gct tta gca ggt ctg gat atg ccg atg ccc ggt gat gtt 912
 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Val
 290 295 300

15 acc ttc gat agt ggt acg tct ttc tgg ggt gca aac ttg acg gtc ggt 960
 Thr Phe Asp Ser Gly Thr Ser Phe Trp Gly Ala Asn Leu Thr Val Gly
 305 310 315 320

20 gtc ctt aac ggt aca atc ccc caa tgg cgt gtt gat gac atg gct gtc 1008
 Val Leu Asn Gly Thr Ile Pro Gln Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
 325 330 335

25 ogt atc atg gcc gct tat tac aag gtt ggc cgc gac acc aaa tac acc 1056
 Arg Ile Met Ala Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Thr Lys Tyr Thr
 340 345 350

30 cct ccc aac ttc agc tcg tgg acc agg gac gaa tat ggt ttc gcg cat 1104
 Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Ala His
 355 360 365

35 aac cat gtt tcg gaa ggt got tac gag agg gtc aac gaa ttc gtg gac 1152
 Asn His Val Ser Glu Gly Ala Tyr Glu Arg Val Asn Glu Phe Val Asp
 370 375 380

40 gtg caa cgc gat cat gcc gac cta atc cgt cgc atc ggc gcg cag agc 1200
 Val Gln Arg Asp His Ala Asp Leu Ile Arg Arg Ile Gly Ala Gln Ser
 385 390 395 400

45 act gtt ctg ctg aag aac aag ggt gcc ttg ccc ttg agc cgc aag gaa 1248
 Thr Val Leu Leu Lys Asn Lys Gly Ala Leu Pro Leu Ser Arg Lys Glu
 405 410 415

50 aag ctg gtc gcc ctt ctg gga gag gat gcg ggt tcc aac tcg tgg ggc 1296
 Lys Leu Val Ala Leu Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Ser Trp Gly
 420 425 430

55 gct aac ggc tgt gat gac cgt ggt tgc gat aac ggt acc ctt gcc atg 1344
 Ala Asn Gly Cys Asp Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
 435 440 445

60 gcc tgg ggt agc ggt act gcg aat ttc cca tac ctc gtg aca cca gag 1392
 Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
 450 455 460

65 cag gcg att cag aac gaa gtt ctt cag ggc cgt ggt aat gtc ttc gcc 1440
 Gln Ala Ile Gln Asn Glu Val Leu Gln Gly Arg Gly Asn Val Phe Ala
 465 470 475 480

70 gtg acc gac agt tgg gcg ctc gac aag atc got gcg gct gcc cgc cag 1488
 Val Thr Asp Ser Trp Ala Leu Asp Lys Ile Ala Ala Ala Ala Arg Gln
 485 490 495

75 gcc agc gta tct ctc gtg ttc gtc aac tcc gac tca gga gaa gcc tat 1536
 Ala Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ser Asp Ser Gly Glu Gly Tyr
 500 505 510

ES 2 350 903 T3

ott agt gtg gat gga aat gag ggc gat cgt aac aac atc act ctg tgg 1584
 Leu Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Asn Asn Ile Thr Leu Trp
 515 520 525

5 aag aac ggc gac aat gtg gtc aag acc gca gcg aat aac tgt aac aac 1632
 Lys Asn Gly Asp Asn Val Val Lys Thr Ala Ala Asn Asn Cys Asn Asn
 530 535 540

10 acc gtc gtc atc atc cac tcc gtc gga cca gtt ttg atc gat gaa tgg 1680
 Thr Val Val Ile Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Glu Trp
 545 550 555 560

15 tat gac cac ccc aat gtc act ggt att ctc tgg gct ggt ctg cca ggc 1728
 Tyr Asp His Pro Asn Val Thr Gly Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 565 570 575

20 cag gag tot ggt aac tcc att gcc gat gtg ctg tac ggt cgt gtc aac 1776
 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Ile Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 580 585 590

25 cct ggc gcc aag tct cct ttc act tgg ggc aag acc cgg gag tgg tat 1824
 Pro Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605

30 ggt tct ccc ttg gtc aag gat gcc aac aat ggc aac gga gcg ccc cag 1872
 Gly Ser Pro Leu Val Lys Asp Ala Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620

35 tct gat ttc acc cag ggt gtt ttc atc gat tac cgc cat ttc gat aag 1920
 Ser Asp Phe Thr Gln Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640

40 ttc aat gag acc cct atc tac gag ttt ggc tac ggc ttg agc tac acc 1968
 Phe Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655

45 acc ttc gag ctc tcc gac ctc cat gtt cag ccc ctg aac gcg tcc cga 2016
 Thr Phe Glu Leu Ser Asp Leu His Val Gln Pro Leu Asn Ala Ser Arg
 660 665 670

50 tac act ccc acc agt ggc atg act gaa gct gca aag aac ttt ggt gaa 2064
 Tyr Thr Pro Thr Ser Gly Met Thr Glu Ala Ala Lys Asn Phe Gly Glu
 675 680 685

55 att ggc gat gcg tgg gag tac gtg tat ccg gag ggg ctg gaa agg atc 2112
 Ile Gly Asp Ala Ser Glu Tyr Val Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Arg Ile
 690 695 700

60 cat gag ttt atc tat ccc tgg atc aac tot acc gac ctg aag gca tgg 2160
 His Glu Phe Ile Tyr Pro Trp Ile Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser
 705 710 715 720

65 tot gac gat tct aac tac ggc tgg gaa gac tcc aag tat att ccc gaa 2208
 Ser Asp Asp Ser Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu
 725 730 735

ggc gcc aag gat ggg tct gcc cag ccc cgt ttg ccc get agt ggt ggt 2256
 Gly Ala Thr Asp Gly Ser Ala Gln Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly
 740 745 750

ES 2 350 903 T3

gcc gga gga aac ccc ggt ctg tac gag gat ctt ttc cgc gtc tct gtg 2304
 Ala Gly Gly Asn Pro Gly Leu Tyr Glu Asp Leu Phe Arg Val Ser Val
 755 760 765
 5 aag gtc aag aac acg ggc aat gtc gcc ggt gat gaa gtt cct cag ctg 2352
 Lys Val Iys Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu
 770 775 780
 10 tac gtt tcc cta ggc ggc ccg aat gag ccc aag gtg gta ctg cgc aag 2400
 Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys
 785 790 795 800
 15 ttt gag cgt att cac ttg gcc cct tcg cag gag gcc gtg tgg aca acg 2448
 Phe Glu Arg Ile His Leu Ala Pro Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr
 805 810 815
 20 acc ctt acc cgt cgt gac ctt gca aac tgg gac gtt tcg gct cag gac 2496
 Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp
 820 825 830
 25 tgg acc gtc act cct tac ccc aag acg atc tac gtt gga aac tcc tca 2544
 Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser
 835 840 845
 30 cgg aaa ctg ccg ctc cag gcc tcg ctg cct aag gcc cag taa 2586
 Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Lys Ala Gln
 850 855 860

<210> 43

<211> 861

35 <212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 43

40 Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val
 1 5 10 15
 45 Val Ser Ala Lys Asp Asp Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser
 20 25 30
 50 Pro Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Glu Val Tyr Lys Arg Ala
 35 40 45
 55 Val Asp Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Thr Glu Lys Val Asn Leu Thr
 50 55 60
 60 Thr Gly Thr Gly Trp Gln Leu Glu Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser
 65 70 75 80
 65 Val Pro Arg Leu Asn Ile Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu
 85 90 95

ES 2 350 903 T3

5 Gly Ile Arg Phe Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn
100 105 110

10 Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Gln Ala
115 120 125

15 Met Gly Glu Glu Phe Ser Asp Lys Gly Ile Asp Val Gln Leu Gly Pro
130 135 140

20 Ala Ala Gly Pro Leu Gly Ala His Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu
145 150 155 160

25 Gly Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr
165 170 175

30 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr
180 185 190

35 Ile Met Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Gln Pro Glu Ala Ala Gly
195 200 205

40 Tyr Gly Phe Asn Val Ser Asp Ser Leu Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys
210 215 220

45 Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala
225 230 235 240

50 Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr
245 250 255

55 Gly Cys Glu Asn Ser Glu Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu
260 265 270

60 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Thr Ala His His Ser Gly
275 280 285

65 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Val
290 295 300

Thr Phe Asp Ser Gly Thr Ser Phe Trp Gly Ala Asn Leu Thr Val Gly
305 310 315 320

Val Leu Asn Gly Thr Ile Pro Gln Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
325 330 335

ES 2 350 903 T3

Arg Ile Met Ala Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Thr Lys Tyr Thr
 340 345 350
 5
 Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Ala His
 355 360 365
 10
 Asn His Val Ser Glu Gly Ala Tyr Glu Arg Val Asn Glu Phe Val Asp
 370 375 380
 15
 Val Gln Arg Asp His Ala Asp Leu Ile Arg Arg Ile Gly Ala Gln Ser
 385 390 395 400
 20
 Thr Val Leu Leu Lys Asn Lys Gly Ala Leu Pro Leu Ser Arg Lys Glu
 405 410 415
 25
 Lys Leu Val Ala Leu Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Ser Trp Gly
 420 425 430
 30
 Ala Asn Gly Cys Asp Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
 435 440 445
 35
 Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
 450 455 460
 40
 Gln Ala Ile Gln Asn Glu Val Leu Gln Gly Arg Gly Asn Val Phe Ala
 465 470 475 480
 45
 Val Thr Asp Ser Trp Ala Leu Asp Lys Ile Ala Ala Ala Ala Arg Gln
 485 490 495
 50
 Ala Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ser Asp Ser Gly Glu Gly Tyr
 500 505 510
 55
 Leu Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Asn Asn Ile Thr Leu Trp
 515 520 525
 60
 Lys Asn Gly Asp Asn Val Val Lys Thr Ala Ala Asn Asn Cys Asn Asn
 530 535 540
 65
 Thr Val Val Ile Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Glu Trp
 545 550 555 560
 Tyr Asp His Pro Asn Val Thr Gly Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 565 570 575

ES 2 350 903 T3

5 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Ile Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 580 585 590
 10 Pro Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605
 15 Gly Ser Pro Leu Val Lys Asp Ala Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620
 20 Ser Asp Phe Thr Gln Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640
 25 Phe Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655
 30 Thr Phe Glu Leu Ser Asp Leu His Val Gln Pro Leu Asn Ala Ser Arg
 660 665 670
 35 Tyr Thr Pro Thr Ser Gly Met Thr Glu Ala Ala Lys Asn Phe Gly Glu
 675 680 685
 40 Ile Gly Asp Ala Ser Glu Tyr Val Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Arg Ile
 690 695 700
 45 His Glu Phe Ile Tyr Pro Trp Ile Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser
 705 710 715 720
 50 Ser Asp Asp Ser Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu
 725 730 735
 55 Gly Ala Thr Asp Gly Ser Ala Gln Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly
 740 745 750
 60 Ala Gly Gly Asn Pro Gly Leu Tyr Glu Asp Leu Phe Arg Val Ser Val
 755 760 765
 65 Lys Val Lys Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu
 770 775 780
 70 Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys
 785 790 795 800
 75 Phe Glu Arg Ile His Leu Ala Pro Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr
 805 810 815

ES 2 350 903 T3

Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp
 820 825 830

5 Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser
 835 840 845

10 Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Lys Ala Gln
 850 855 860

<210> 44

15 <211> 31

<212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

20 <400> 44

actggattta ccatgagatt cggttggctc g

31

25 <210> 45

<211> 31

<212> ADN

30 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 45

agtcacctct agttactagt agacacgggg C

31

35 <210> 46

<211> 3060

40 <212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 46

45 atgagattcg gttggetcga ggtggccgct ctgacggccg cttctgtage caatgcccag 60
 gtttgtgatg ctttcccgtc attgtttcgg atatagttga caatagtcac ggaataatc 120
 aggaattggc tttctctcca ccattctacc cttegccctg ggctgatggc cagggagagt 180
 50 gggcagatgc ccacgcacgc gccgtcgaga tegtctctca gatgacactg gcggagaagg 240
 ttaaccttac aacgggtact ggggtgggtg cgactttttt gttgacagtg agctttcttc 300
 actgaccatc tacacagatg ggaatggac cgatgdcgcb gtcaaaaccgg cagcgttccc 360
 55 aggtaagctc gcaattctgc aacaacgtgc aagtgtagtt gctaaaaccg ggtggtgcag 420
 acttggtate aactggggtc tttgtggcca ggattcccc ttgggtatcc gttctctgtga 480
 gctatacccg cggagttctt cagtccttgt attatgtgct gatgattgtc tctgtatagc 540
 60 tgacctcaac tccgccttcc ctgctggtae taatgtcgcc gcgacatggg acaagacact 600
 cgcctacctt cgtggcaagg ccattgggtga ggaattcaac gacaagggcg tggacatttt 660
 65 gctggggcct gctgctggtc ctctcggcaa ataccgggac ggcggcagaa tctgggaagg 720

ES 2 350 903 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

cttctctcct gatccgggttc tcaactgggtg aottttccgcc gaaactatca aggggtatcca 780
 agaoggggggt gtgattgota ctgccaaagca ttacattctg aatgaaocagg agcattttocg 840
 acaggttggc gaggcccagg gatctgggta caacatcacg gagacgatca gctccaaacgt 900
 ggatgacaag accatgcacg agttgtacct ttgggtgagta gttgacaotg caaatgagga 960
 ccttgattga tttgactgac ctggaatgca ggccctttgc agatgctctg cggggtaaga 1020
 ttttccgtag acttgacctc ggcacgaaga aatcgctgac gaaccatcgt agctggcgtt 1080
 ggcgctgtca tgtgttccca caatcaaatc aacaacagct acggttgtca aaacagtcaa 1140
 actctcaaca agctcctcaa ggctgagctg ggcttccaag gcttcgtcat gagtgactgg 1200
 agcgtctacc acagcgggtg cggcgctgcc ctcgctgggt tggatatgtc gatgcctgga 1260
 gacatttccct tgcacgacgg actctccttc tggggcacga acctaacctg cagtgttctt 1320
 aacggcaccg ttccagcctg gctgtctgat gadatggctg ttcgtatcat gaccgctac 1380
 tacaagggtg gtctgaccg tcttcgtatt ccccctaact tcagctcctg gaccgggat 1440
 gagtacggct gggagcattc tgctgtctcc gaggggagct ggaccaagggt gaacgacttc 1500
 gtcaatgtgc agcgcagtca ctctcagatc atccgtgaga ttgggtgccg tagtacagtg 1560
 ctcttgaaga acacgggtg tcttcctttg accggcaagg aggttaaagt ggggttcttc 1620
 ggtgaagacg ctggttccaa cccgtgggggt gctaaaggct gccccgacgg oggtgtgat 1680
 aacggcaotc ttgotatggc ctggggtagt ggtactgcca aottccotta ccttgtcacc 1740
 cccgagcagg ctatccagcg agaggctcctc agcaacggcg gcaatgtctt tgctgtgact 1800
 gataacgggg ctctcagcca gatggcagat gttgcctctc aatccagggt agtgggggct 1860
 cttaga meta gaaactcttc tgaatgaagt ttttaacca ttgcgaacag cgtgtctttg 1920
 gtgtttgtca acgcgcactc tggagagggt ttcatcagtg tcgacggcaa cgagggtgac 1980
 cgcaaaatc tcaactctgtg gaagaacggc gaggccgtca ttgacactgt tgcagccac 2040
 tgcacaaca cgttgtgggt tattccacgt gttgggcccg tcttgatcga ccggtgggtat 2100
 gataaccccc acgtcactgc catcatctgg gccggctttg ccggtcaggga gagtggcaac 2160
 tccctggctg acgtgtctca tggccgctc aaccccagcg caaagaaccc gttcaactgg 2220
 ggcaagactc gggagtctta cggggctccc ttgctcaccg agcctaacaa tggcaatggt 2280
 gctcccagg atgatttcaa cgaggscgtc ttcatgact accgtcactt tgacaagcgc 2340
 aatgagacc ccaatttatga gtttggcaat ggcttgagct acaccacctt tggttactct 2400
 caoottggg ttoaggcct caatagttcg agttcggcat atgtcccgac tagcggagag 2460
 adcaagcctg cgcdaacctc tgggtgagato ggtagtgcgg ccgaactacct gtatcccag 2520

ES 2 350 903 T3

ggtctcaaaa gaattaccaa gtttatttac ccttggetca actcgaccga cctcgaggat 2580
 tcttctgacg acccgaaacta cggctgggag gacteggagt acattcccga aggcgctagg 2640
 gatgggtctc ctcaaccct cctgaaggct ggcggcgtc ctggtggtaa cctaccctt 2700
 taccaggatc ttgttagggt gtccggcacc ataaccaaca ctggtaacgt cgcgggttat 2760
 gaagtccctc aattggtgag tgaccocgat gttccttgcg ttgcatttg gctaactgc 2820
 ttctagtatg tttcactggg cggaccgaac gagcctcggg tcgttctgcg caagttcgac 2880
 cgaatcttcc tggctcctgg ggagcaaaag gtttggacca cgactcttaa cggtcgtgat 2940
 ctogccaatt gggatgtgga ggctcaggac tgggtcatca caaagtacc caagaaagtg 3000
 cacgtoggca gctcctcgcg taagctgctt ctgagagcgc ctctgcccg tgtctactag 3060

<210> 47

<211> 863

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 47

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

ES 2 350 903 T3

Ala Ala Gly Pro Leu Gly Lys Tyr Pro Asp Gly Gly Arg Ile Trp Glu
 145 150 155 160

5
 Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr
 165 170 175

10
 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr
 180 185 190

15
 Ile Leu Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Gly Glu Ala Gln Gly
 195 200 205

20
 Tyr Gly Tyr Asn Ile Thr Glu Thr Ile Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys
 210 215 220

25
 Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala
 225 230 235 240

30
 Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr
 245 250 255

35
 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Ser Ala His His Ser Gly
 275 280 285

40
 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile
 290 295 300

45
 Ser Phe Asp Asp Gly Leu Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Val Ser
 305 310 315 320

50
 Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
 325 330 335

55
 Arg Ile Met Thr Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Arg Ile
 340 345 350

60
 Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Trp Glu His
 355 360 365

65
 Ser Ala Val Ser Glu Gly Ala Trp Thr Lys Val Asn Asp Phe Val Asn
 370 375 380

ES 2 350 903 T3

Val Gln Arg Ser His Ser Gln Ile Ile Arg Glu Ile Gly Ala Ala Ser
 385 390 395 400

5

Thr Val Leu Leu Lys Asn Thr Gly Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu
 405 410 415

10

Val Lys Val Gly Val Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly
 420 425 430

15

Ala Asn Gly Cys Pro Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
 435 440 445

20

Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
 450 455 460

25

Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala
 465 470 475 480

30

Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln
 485 490 495

35

Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe
 500 505 510

40

Ile Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp
 515 520 525

45

Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn
 530 535 540

50

Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Arg Trp
 545 550 555 560

55

Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 565 570 575

60

Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 580 585 590

65

Pro Ser Ala Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605

Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620

ES 2 350 903 T3

5 Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640

10 Arg Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655

15 Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
 660 665 670

20 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
 675 680 685

25 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
 690 695 700

30 Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 705 710 715 720

35 Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
 725 730 735

40 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
 740 745 750

45 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
 755 760 765

50 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
 770 775 780

55 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 785 790 795 800

60 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815

65 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830

70 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845

75 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860

ES 2 350 903 T3

<210> 48

<211> 2592

<212> ADN

5 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 48

10 atgagattcg gttggctcga ggtggccgct ctgacggccg cttctgtagc caatgccccag 60
 gaattggctt tctctccacc attctaccct tgccttggg ctgatggcca gggagagtgg 120
 15 gcagatgccc atcgacgcgc cgtcgagatc gttctcaga tgacactggc ggagaaggtt 180
 aaccttaca cgggtactgg atgggaatg gaccgatggc tcggtaaac cggcagcgtt 240
 cccagacttg gtatcaactg gggcttttgt ggccaggatt ccccttggg tatccgtttc 300
 20 tctgacctca actccgcctt cccctgctgt actaatgtcg ccgagacatg ggacaagaca 360
 ctgcctacc ttcgtggcaa ggcctgggt gaggaattca acgacaaggc cgtggacatt 420
 25 ttgctggggc ctgctgctgg tctctcggc aaatacccg acggcggcag aatctgggaa 480
 ggcttctctc ctgatccggt tctcactggt gtacttttcg ccgaaactat caagggtatc 540
 30 caagacgcgg gtgtgattgc tactgccaaq cattacattc tgaatgaaca ggagcatttc 600
 cgacagggtg gcgaggccca gggatatggt tacaacatca cggagacgat cagctccaac 660
 gtggatgaca agaccatgca cgagttgtac ctttggccct ttgcagatgc tgtgcgcgct 720
 35 ggcgttggcg ctgtcatgtg ttctacaat caaatcaaca acagctaagg ttgtcaaac 780
 agtcaaacct tcaacaagct cctcaaggct gagctgggct tccaaggctt cgtcatgagt 840
 40 gactggagcg ctaccacag cgggtgctggc gctgcccctg ctgggttggg tatgtcgatg 900
 cctggagaca ttctctcga cgacggactc tcttctcggg gcacgaaact aactgtcagt 960
 gttcttaacg gcaccgctcc agcctggcgt gtcgatgaca tggctgttcg tatcatgacc 1020
 45 gogtactaca aggttggctg tgaccgtctt cgtattccc ctaacttcag ctctggacc 1080
 cgggatgagt acggctggga gcattctgct gtctccagg gagcctggac caaggatgac 1140
 50 gacttcgtca atgtgcagcg cagtaoctct cagatcatcc gtgagattgg tgccgctagt 1200
 acagtgcctc tgaagaacac gggctgctct cctttgaccg gcaaggagggt taaagtgggt 1260
 55 gttctcggty aagacgctgg ttccaaccg tggggtgcta acggctgccc cgaccgcggc 1320
 tgtgataacg gcactcttgc tatggcctgg ggtagtggta ctgccaactt ccctaacctt 1380
 gtcacccccg agcaggctat ccagcgagag gtcacagca acggcggcaa tgtctctgct 1440
 60 gtgactgata acggggctct cagccagatg gcagatgttg catctcaatc cagcgtgtct 1500
 ttgggtgttg tcaacgcoga ctctggagag ggttccatca gtgtogaagg caacgagggt 1560

65

ES 2 350 903 T3

5 gaccgcaada atctcactct gtggaagaac ggcgaggccg tcattgacac tgttgcagc 1620
 cactgcaaca acacgattgt ggttattcac agtgttgggc cgtcttgat cgaccggtgg 1680
 10 tatgataacc ccaacgtcac tgccatcacc tgggdcggct tgcccggcca ggagagtggc 1740
 aactccctgg tcgacgtgct ctatggccgc gtcaacccca gogccagac cccgttcacc 1800
 tggggcaaga ctggggagtc ttacggggct ccttctgcca cggagcctaa caatggcaat 1860
 ggtgctcccc aggatgattt caacgagggc gtcttcattg actaccgtca ctttgacaag 1920
 15 cgcaatgaga cccccattta tgagtttggc catggcttga gctacaccac ctttggktao 1980
 tctcaccttc ggggttcaggc cctcaatagt tcgagttogg catatgtccc gactagcgga 2040
 gagaccaagc ctgcgccaac ctatgggtgag atcggtagtg ccgcccacta cctgtatccc 2100
 20 gaggggtotca aaagaattac caagtattt tacccttggc tcaactcgac cgacctogag 2160
 gattctctcg acgaccgaa ctacggctgg gaggactcgg agtacattcc cgaaggcgt 2220
 agggatgggt ctctcaacc cctcctgaag gctggcggcg ctctgggtgg taacctacc 2280
 ctttatcagg atcttgttag ggtgtcggcc accataacca acactggtaa cgtcgcgggt 2340
 25 tatgaagtoc ctcaattgta tgtttcactg ggcggaccga acgagcctcg ggtcgttctg 2400
 cgcaagttcg accgaatctt cctggctcct ggggagcaaa aggtttggac cagactctt 2460
 aaccgtcgtg atctcgccaa ttgggatgtg gaggctcagg actgggtcat cacaaagtac 2520
 30 cccaagaaag tgcacgtcgg cagctcctcg cgttagctgc ctctgagagc gcctctgccc 2580
 35 cgtgtctact ag 2592

40 <210> 49
 <211> 863
 <212> PRT
 45 <213> *Aspergillus fumigatus*
 <400> 49

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

ES 2 350 903 T3

Gly Thr Gly Trp Glu Met Asp Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser Val
 65 70 75 80
 5
 Pro Arg Leu Gly Ile Asn Trp Gly Leu Cys Gly Gln Asp Ser Pro Leu
 85 90 95
 10
 Gly Ile Arg Phe Ser Asp Leu Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Asn
 100 105 110
 15
 Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala
 115 120 125
 20
 Met Gly Glu Glu Phe Asn Asp Lys Gly Val Asp Ile Leu Leu Gly Pro
 130 135 140
 25
 Ala Ala Gly Pro Leu Gly Lys Tyr Pro Asp Gly Gly Arg Ile Trp Glu
 145 150 155 160
 30
 Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr
 165 170 175
 35
 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr
 180 185 190
 40
 Ile Leu Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Gly Glu Ala Gln Gly
 195 200 205
 45
 Tyr Gly Tyr Asn Ile Thr Glu Thr Ile Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys
 210 215 220
 50
 Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala
 225 230 235 240
 55
 Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr
 245 250 255
 60
 Gly Cys Gln Asn Ser Gln Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu
 260 265 270
 65
 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Ser Ala His His Ser Gly
 275 280 285
 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile
 290 295 300

ES 2 350 903 T3

Ser Phe Asp Asp Gly Leu Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Val Ser
 305 310 315 320
 5
 Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
 325 330 335
 10
 Arg Ile Met Thr Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Arg Ile
 340 345 350
 15
 Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Trp Glu His
 355 360 365
 20
 Ser Ala Val Ser Glu Gly Ala Trp Thr Lys Val Asn Asp Phe Val Asn
 370 375 380
 25
 Val Gln Arg Ser His Ser Gln Ile Ile Arg Glu Ile Gly Ala Ala Ser
 385 390 395 400
 30
 Thr Val Leu Leu Lys Asn Thr Gly Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu
 405 410 415
 35
 Val Lys Val Gly Val Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly
 420 425 430
 40
 Ala Asn Gly Cys Pro Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
 435 440 445
 45
 Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
 450 455 460
 50
 Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala
 465 470 475 480
 55
 Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln
 485 490 495
 60
 Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe
 500 505 510
 65
 Ile Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp
 515 520 525
 Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn
 530 535 540

ES 2 350 903 T3

Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Arg Trp
 545 550 555 560
 5
 Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 565 570 575
 10
 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 580 585 590
 15
 Pro Ser Ala Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605
 20
 Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620
 25
 Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640
 30
 Arg Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655
 35
 Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
 660 665 670
 40
 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
 675 680 685
 45
 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
 690 695 700
 50
 Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 705 710 715 720
 55
 Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
 725 730 735
 60
 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
 740 745 750
 65
 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
 755 760 765
 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
 770 775 780

ES 2 350 903 T3

Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 795 790 795 800

5

Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815

10

Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830

15

Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845

20

Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860

<210> 50

25

<211> 29

<212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

30

<400> 50

gctcatgag attcggttgg ctcgaggtc

29

35

<210> 51

<211> 30

<212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

40

<400> 51

gccgttatca cagccgcggt cggggcagcc

30

45

<210> 52

<211> 30

<212> ADN

50

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 52

55

ggctgccccg accgcggctg tgataacggc

30

<210> 53

<211> 35

60

<212> > ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 53

65

gcttaattaa tctagtagac acggggcaga ggcgc

35

ES 2 350 903 T3

	<210> 54	
	<211> 16	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<400> 54	
10	acactggcgg agaagg	16
	<210> 55	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<400> 55	
20	gcccagggat atggttac	18
	<210> 56	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
30	<400> 56	
	cgactctgga gaggtttc	19
35	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<400> 57	
45	ggactgggtc atcacaag	19
	<210> 58	
	<211> 17	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<400> 58	
55	gcgagaggtc atcagca	17
	<210> 59	
60	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
65	<400> 59	
	gtaaacgac ggccagt	17

