

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C12N 15/53, 9/06, 15/90	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 98/48019 (43) Fecha de publicación internacional: 29 de Octubre de 1998 (29.10.98)
--	-----------	---

(21) Solicitud internacional: PCT/ES98/00101 (22) Fecha de la presentación internacional: 17 de Abril de 1998 (17.04.98) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9700833 18 de Abril de 1997 (18.04.97) ES (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): ANTIBIOTICOS, S.A. [ES/ES]; Avenida de Burgos, 8-A, E-28036 Madrid (ES). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): FERNANDEZ CAÑON, José Manuel [ES/ES]; Calle Velazquez, 146, E-28002 Madrid (ES). RODRIGUEZ SAIZ, Marta [ES/ES]; Calle Tui, 6, 1º C, Pontevedra, E-36209 Vigo (ES). DIEZ GARCIA, Bruno [ES/ES]; Calle Generalísimo Franco, 7, Trobajo del Cerecedo, E-24192 León (ES). BARREDO FUENTE, José Luis [ES/ES]; Calle Moisés de León, 15 - 2ºB, E-24006 León (ES). VITALLER ALBA, Alejandro [ES/ES]; Calle Carmen, 3, E-24001 León (ES). SALTO MALDONADO, Francisco [ES/ES]; Calle del Abrego, 33 - 2ºC, Prado de Somosaguas, E-28023 Madrid (ES). PEÑALVA SOTO, Miguel Angel [ES/ES]; Avenida de Burgos, 8-A, E-28036 Madrid (ES). MINGOT ASCENÇAO,	(74) Mandatario: DE ELZABURU MARQUEZ, Alberto; Calle Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES). (81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publicada Con informe de búsqueda internacional. Con una indicación relativa a material biológico depositado, presentada de conformidad con lo dispuesto en la Regla 13bis, separadamente, y no con la descripción.
---	---

(54) Title: PROCESS FOR THE INACTIVATION OF GENES WHICH CODE FOR ENZYMES FOR THE CATABOLISM OF PHENYL ACETATE, PLASMIDS INVOLVED IN SUCH PROCESS AND STRAINS TRANSFORMED THEREWITH

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE INACTIVACION DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DEL CATABOLISMO DEL FENILACETATO, PLASMIDOS QUE INTERVIENEN Y CEPAS TRANSFORMADAS CON LOS MISMOS

(57) Abstract

Process for inactivating genes which code for enzymes of the phenyl acetate catabolism, plasmids containing them and strains transformed therewith. The process applies preferably to the gene *phacA* of *A.nidulans* and to the gene *pahA* of *P. chrysogenum*, genes which code respectively for competitor enzymes for this substrate with the biosynthetic enzymes of penicillin. The non expression of said enzymes favors the synthesis of this antibiotic, increasing its production, with a smaller demand of phenyl acetate per culture unit.

phacA
 Nae I (1093) KpnI (1382) BamHI
 0.9 kb 109 kb 1.2 kb
 X X
 argB⁺ (3.2 kb)
 ↓
 phacA::argB⁺
 Nae I BamHI

(57) Resumen

Procedimiento de inactivación de genes que codifican para enzimas del catabolismo de fenilacetato, plásmidos que los contienen y cepas transformadas con los mismos. El procedimiento se aplica preferentemente al gen *phacA* de *A. nidulans* y al gen *pahA* de *P. chrysogenum*, genes que codifican respectivamente para enzimas competidoras por este sustrato con las enzimas biosintéticas de penicilina. La no expresión de estas enzimas favorece la síntesis de este antibiótico, incrementando su producción, con una demanda de fenilacetato menor por unidad de cultivo.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Mali	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabue
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelanda		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

PROCEDIMIENTO DE INACTIVACION DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DEL CATABOLISMO DEL FENILACETATO, PLASMIDOS QUE INTERVIENEN Y CEPAS TRANSFORMADAS CON LOS MISMOS.

5

Campo de la invención

La presente invención se basa en la caracterización de nuevos compuestos de ADN y moléculas de ADN recombinante que codifican para la enzima fenilacetato 2-hidroxilasa obtenidos de los hongos filamentosos *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum*. La transformación de cepas productoras de penicilina con los compuestos de ADN anteriormente mencionados, permite incrementar la producción de este antibiótico.

Estado de la técnica

El último paso de la ruta biosintética de bencilpenicilina (penicilina G) en ciertos hongos filamentosos consiste en la conversión de isopenicilina N en penicilina G. Esto implica una reacción de transacilación, en la cual la cadena lateral de L-aminoadipato de la isopenicilina N es substituida por otra de ácido fenilacético. La enzima que cataliza esta reacción (acil-CoA:isopenicilina N aciltransferasa) utiliza ácido fenilacético activado en forma de un tioéster de coenzima A (CoA) como uno de sus substratos.

Penicillium chrysogenum, el hongo utilizado para la producción industrial de penicilina, así como *Aspergillus nidulans*, son incapaces de sintetizar fenilacetato. Por consiguiente, para favorecer la biosíntesis de penicilina G, es preciso añadir un exceso de fenilacetato a los cultivos industriales de *P. chrysogenum*. Este exceso, que impide la biosíntesis no deseada de otras penicilinas con

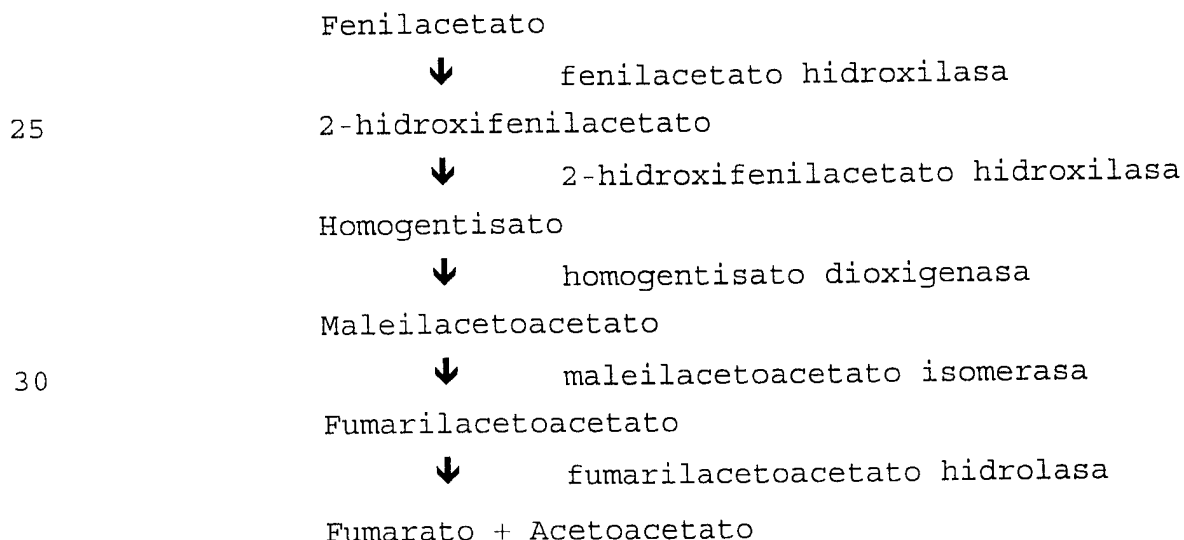
- 2 -

cadena lateral alifáticas, incrementa los costes finales del proceso de fermentación.

Una parte del fenilacetato añadido a los cultivos de producción de penicilina puede ser metabolizada. Es un hecho perfectamente establecido que en las fermentaciones de *P. chrysogenum* se acumula una cantidad considerable de 2-hidroxifenilacetato. Esta fracción de precursor de la cadena lateral obviamente no contribuye a la biosíntesis de penicilina G.

10 Tanto *Aspergillus nidulans* como *P. chrysogenum* sintetizan penicilina a partir de tres aminoácidos precursores a través de los mismos pasos enzimáticos. Asimismo, al igual que *P. chrysogenum*, *A. nidulans* convierte una fracción de fenilacetato en 2-hidroxifenilacetato cuando se añade el primer compuesto en exceso a los cultivos. Además de convertir el fenilacetato en 2-hidroxifenilacetato, *A. nidulans* puede catabolizar también este último compuesto y, de hecho, es capaz de usar fenilacetato como única fuente de carbono.

20 La ruta catabólica en *A. nidulans* se describe en el siguiente esquema:



- 3 -

La orto-hidroxilación del fenilacetato es el primer paso de esta ruta. Una segunda reacción hidroxilante convierte el 2-hidroxifenilacetato en 2,5-dihidroxifenilacetato (= homogentisato). El homogentisato es catabolizado a través de fumarilacetoacetato en fumarato y acetoacetato, los cuales se incorporan en el ciclo de Krebs (véase Fernández Cañón y Peñalva, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9132-9136, 1995).

La capacidad de los citados hongos filamentosos para catabolizar parcial o totalmente fenilacetato es una característica perjudicial en la producción de penicilina. Por lo tanto, la eliminación total o parcial de esta característica daría como resultado cepas con capacidad de producción de penicilina G mejorada.

La eliminación mediante mutagénesis clásica de esta característica perjudicial (es decir, de la capacidad para catabolizar parcial o totalmente fenilacetato) en los hongos productores de penicilina, exigiría enormes esfuerzos de selección entre un gran número de cepas. Por otra parte, dicha mutagénesis con frecuencia origina segundas mutaciones que podrían eliminar características útiles de las cepas parentales, generando, por ejemplo, mutaciones auxotróficas o mutaciones que disminuyan el vigor de crecimiento o conidiación críticos para la fermentación industrial. Por lo tanto, es adecuado usar técnicas de ingeniería genética, carentes de las citadas limitaciones, para eliminar la capacidad de catabolizar total o parcialmente fenilacetato. Un requisito esencial para realizar ingeniería genética dirigida es la clonación y la caracterización del o de los genes que median la anteriormente mencionada característica perjudicial de los hongos productores de penicilina.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención pretende resolver los problemas existentes del Estado de la Técnica anteriormente enumerados. Consiste en caracterizar un gen fúngico

- 4 -

que codifica para una actividad fenilacetato 2-hidroxilasa, enzima que cataliza el primer paso enzimático del catabolismo de fenilacetato en *Aspergillus* y *Penicillium* y su uso para eliminar el gen presente en el genoma de los hongos productores de penicilina mediante tecnología de ADN recombinante. La presente patente describe cómo este gen es inactivado en una cepa construida por ingeniería genética. Esta cepa, que es incapaz de catabolizar fenilacetato, produce niveles más altos de penicilina que la cepa parental. Además, la producción máxima de penicilina de esta cepa recombinante requiere un menor exceso de fenilacetato que el que necesita la cepa parental. La inactivación del catabolismo de fenilacetato usando el (los) anterior(es) compuesto(s) de ADN tiene como resultado una mejora importante de la producción de penicilina.

La secuencia de un fragmento de ADN genómico de 1.986 pares de bases (pb) de *A. nidulans*, que incluye el nuevo gen usado para la presente invención se muestra en SEQ ID NO:1. El gen se denominó *phacA* (phac por la utilización de phenylacetate (fenilacetato)) y codifica para una enzima que orto-hidroxila fenilacetato (siendo dicha reacción el primer paso del catabolismo de fenilacetato en *A. nidulans*). La secuencia de nucleótidos de los clones de ADN complementario (cADN) que cubren la región codificante completa y su posterior alineamiento con la secuencia de ADN genómico revelaron las siguientes características de este gen:

- El gen codifica para un polipéptido de 518 aminoácidos. La primera metionina está codificada por un triplete ATG en posición 82, mientras que el codón de fin (TAG) está situado en la posición 1810. Estas posiciones se corresponden con la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.

- La región codificante está interrumpida por tres intrones de 65, 56 y 53 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO. 1).

- 5 -

- El polipéptido deducido de 518 residuos se muestra en el código de aminoácidos de tres letras, debajo de sus correspondientes exones en SEQ ID NO: 1 y también, en un contexto aislado, en SEQ ID NO: 2. El peso molecular de la proteína deducida es de 58.495 g/mol. Una búsqueda realizada utilizando el servidor de acceso público BLAST del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, USA) en las bases de datos de secuencias de proteínas (por ejemplo SwissProt y PIR) y en la traducción conceptual de bases de datos de secuencias de ADN (por ejemplo las bases de datos GenBank y EMBL) en los seis marcos de lectura posibles, revelaron similitud de la secuencia de aminoácidos con miembros de la familia del citocromo P450 (proteína hemotiolada). Estas proteínas intervienen generalmente en procesos oxidativos. De hecho, las secuencias entre los residuos 431 a 439 corresponden al péptido que contiene el aminoácido cisteína Gly-X-Gly-X-X-X-Cys-X-Gly (donde X indica cualquier aminoácido) que interviene en la unión del grupo hemo, el cual es característico de estas proteínas hemotioladas.

El nuevo compuesto de ADN, cuya estructura se describe con detalle en SEQ ID NO:1 y que se aisló de un microorganismo natural, puede ser sintetizado totalmente utilizando sintetizadores de ADN automáticos. Además, debido a la naturaleza degenerada del código genético, la proteína codificada por el nuevo compuesto de ADN podría ser codificada por secuencias de ADN alternativas. Estas se incluyen en la presente invención. Por otro lado, cualquier variante genética natural derivada del nuevo compuesto de ADN anteriormente descrito se considera equivalente al mismo. Estas variantes genéticas incluyen genes homólogos en organismos estrechamente relacionados con *A. nidulans* en términos evolutivos, tales como *P. chrysogenum*. Estos genes pueden ser fácilmente identificados usando el compuesto de ADN de *A. nidulans* como sonda de hibridación tal y como se describirá a continuación.

- 6 -

El gen *phacA* de *A. nidulans* puede ser utilizado como sonda molecular para la búsqueda de genes homólogos funcionales en genotecas genómicas o de cADN de otras especies fúngicas mediante hibridación. Así por ejemplo, en la presente patente se describe su utilización para rastrear una genoteca de *P. chrysogenum*, demostrando que el gen homólogo al *phacA* de *A. nidulans* puede ser aislado de cepas industriales de *P. chrysogenum*. La secuencia de un fragmento de ADN genómico de 2.558 pb de *P. chrysogenum* aislado por hibridación con una sonda del gen *phacA* se muestra en SEQ ID NO:3. El gen de *P. chrysogenum* homólogo al *phacA* de *A. nidulans* se designó *pahA* (por phenylacetate hydroxilation (hidroxilación de fenilacetato)). El gen *pahA* de *P. chrysogenum* codifica para un polipéptido de 516 aminoácidos que muestra un 84 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de *PhacA*, el producto proteico del gen *phacA* de *A. nidulans*. La secuencia del producto del gen *pahA* de *P. chrysogenum* se muestra en SEQ ID NO:4. Como se ha indicado anteriormente, este nuevo compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* también se incluye en la presente invención, así como los demás genes homólogos que se puedan aislar de otras especies de hongos por procedimientos similares.

Los genes clonados pueden ser usados para generar mutaciones de pérdida de función mediante genética inversa. Para ello, se puede construir una nueva molécula de ADN recombinante en un vector de *Escherichia coli*, portador de una versión truncada del gen fúngico, el cual puede ser usado para inactivar el gen endógeno por transformación. Por ejemplo, este plásmido recombinante puede contener la región 5' del gen *phacA* de *A. nidulans*, seguida de una modificación en la región codificante del gen *phacA* consistente en que el fragmento *NaeI-KpnI* de 289 pb se substituya por un fragmento *XbaI* de 3.2 kb que contenga el gen *argB*⁺ de

- 7 -

A. nidulans (véase la Fig. 1). A continuación se dispone la región 3' del gen *phacA*. La expresión de este gen *phacA* mutante tendría como resultado una proteína PhacA truncada en el residuo 297 y, por lo tanto, carente de 221 residuos carboxiterminales. Estos últimos residuos, ausentes en la proteína mutante, comprenden al anteriormente mencionado péptido que incluye el residuo Cys, el cual interviene en la unión de grupos hemo y es esencial para la actividad de este tipo de proteínas.

10 Un fragmento lineal de ADN que contenga las regiones anteriormente mencionadas se puede separar de las secuencias del vector por medio de enzimas de restricción adecuadas y seguidamente purificarse por técnicas estándar. Este fragmento lineal puede utilizarse para la transformación de una cepa *argB* de *A. nidulans* en protótrofa para arginina. Como el ADN utilizado en la transformación carece de secuencias requeridas para su replicación autónoma, los transformantes protótrofos resultan de la integración del fragmento de ADN en el genoma. Uno de los posibles modos de integración que originarían un fenotipo *argB* ocurriría a través de un doble entrecruzamiento entre la molécula de ADN lineal y el locus *phacA* residente en el genoma del hongo, tal como se esquematiza en la Figura 1. Este acontecimiento de doble entrecruzamiento tiene como resultado la substitución del gen *phacA* original por el gen truncado generado in vitro, originando la pérdida de la función *phacA*. Los transformantes portadores de dicha substitución (es decir, con la mutación de pérdida de función) pueden ser reconocidos por su patrón de hibridación cuando su ADN genómico es digerido con las enzimas de restricción adecuadas y analizado mediante hibridación por la técnica de Southern, utilizando como sondas los genes *phacA* o *argB* marcados radiactivamente con ³²P. De esta forma, los patrones de hibridación de otros tipos de transformantes pueden ser distinguidos con facilidad de los correspondientes a una substitución génica. Los transformantes que carecen

- 8 -

de la función proporcionada por el gen *phacA* pueden ser purificados para posteriores ensayos utilizando técnicas estándar.

En contraste con la cepa de tipo silvestre, los transformantes de *A. nidulans* generados por genética inversa que carecen de la función del gen *phacA* no pueden crecer en fenilacetato como única fuente de carbono. Sin embargo, crecen en 2-hidroxifenilacetato o 2,5-dihidroxifenilacetato. Esto demuestra que el nuevo compuesto de ADN (el gen *phacA* de *A. nidulans*) codifica para una actividad enzimática requerida para la orto-hidroxilación de fenilacetato, paso esencial para la utilización de fenilacetato en *A. nidulans*. *P. chrysogenum* no usa fenilacetato como única fuente de carbono pero, como anteriormente se muestra, contiene un gen que codifica para un homólogo de la enzima *PhacA*. Por tanto, el nuevo compuesto de ADN proporciona un método para eliminar conversiones metabólicas laterales que puedan disminuir la acumulación de fenilacetato disponible para la biosíntesis de penicilina.

En *P. chrysogenum* se puede aplicar una metodología similar a la descrita, para inactivar el gen *pahA*, usando el nuevo compuesto de ADN de *P. chrysogenum* incluido en esta invención y cualquiera de los marcadores de transformación ya disponibles para *P. chrysogenum*, por ejemplo el gen *trpC*. También se apreciará que se podrían utilizar otros marcadores de transformación diferentes de *argB* (en *A. nidulans*) o *trpC* (en *P. chrysogenum*) para interrumpir la región codificante del nuevo compuesto de ADN. Estos incluyen otros marcadores auxotróficos (por ejemplo *pyrG* o *riboB*) y genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, los genes que confieren resistencia a fleomicina o higromicina B en hongos). Tales métodos, básicamente equivalentes a los usados aquí, están comprendidos también en la presente invención. La Figura 2 muestra uno de dichos métodos, el

- 9 -

cual se puede usar para alterar el gen *pahA* de *P. chryso-*
genum. En este caso, en la construcción de inactivación, se
ha substituido una región interna del gen *pahA* por un gen
quimérico donde el promotor del gen *gdh* de *P. chrysogenum*
5 (gen que codifica para la actividad enzimática glutamato
deshidrogenasa) controla la expresión del gen bacteriano
ble^r, el cual confiere resistencia al antibiótico fleomi-
cina. El plásmido que incluye la construcción de inactiva-
ción se denomina pALP696. Por tanto, los transformantes se
10 pueden seleccionar por su capacidad para crecer en medios
que contengan fleomicina (Kolar, M., Punt, P.J., van del
Hondel, C.A.M.J.J. y Schwab, H. Gene 62: 127-134, 1.988).

Adicionalmente se pueden usar otras estrategias para
generar, por genética inversa, mutaciones de pérdida de
15 función en un gen que haya sido clonado y caracterizado.
Por ejemplo, la transformación con un plásmido circular
portador de un fragmento interno del gen diana origina,
tras la integración homóloga de una sola copia del ADN
transformante, dos copias incompletas del gen carentes de
20 funcionalidad si se elige adecuadamente el fragmento in-
cluido en el plásmido. Los métodos que utilizan éstas u
otras estrategias diferentes para generar una mutación de
pérdida de función en el gen deseado por medio de genética
inversa también se incluyen en esta invención.

25 Las cepas fúngicas en las que se han eliminado las
enzimas que intervienen en la modificación o catabolismo de
fenilacetato muestran propiedades mejoradas de producción
de penicilina. No obstante, su capacidad de crecimiento en
los medios de producción de penicilina es indistinguible
30 de la de la cepa parental. Por ejemplo, los transformantes
de *A. nidulans* con la substitución del gen *phacA* anterior-
mente descrita (es decir, carente de actividad fenilace-
tato 2-hidroxilasa) producen de 3 a 8 veces más penicilina
que la cepa parental y son menos dependientes de la canti-
35 dad de fenilacetato adicionada (véase la Figura 3). De este
modo, mientras que la reducción de fenilacetato desde el

- 10 -

0,125 % (p/v) al 0,0625 % (p/v) da como resultado una importante disminución de los niveles de producción de penicilina en la cepa silvestre, los transformantes que carecen de la función del gen *phacA* producen niveles de penicilina elevados, con ambas concentraciones de fenilacetato.

Finalmente, esta invención no sólo concierne al gen *phacA* y sus homólogos. Utilizamos aquí el gen que codifica para fenilacetato 2-hidroxilasa, porque esta enzima cataliza el primer paso de la ruta catabólica de fenilacetato y las cepas de producción de *P. chrysogenum* secretan cantidades importantes de 2-hidroxifenilacetato. Una vez caracterizados, se podrían inactivar otros genes que intervienen en el metabolismo de fenilacetato utilizando un método similar al aquí descrito. Esta invención, es decir, que la productividad de penicilina de los organismos fúngicos puede ser mejorada inactivando genes individuales del metabolismo del fenilacetato mediante el uso de genética inversa, también cubre estas posibilidades alternativas.

20

Ejemplos

EJEMPLO 1. CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN *phacA* de *A. nidulans*.

25

Los clones de cADN correspondientes al gen *phacA* se aislaron mediante selección diferencial de una genoteca de cADN, siguiendo los pasos que se describen a continuación:

30 a) Obtención de una población de cADN correspondiente a transcritos de genes que se expresan preferentemente al cultivar el hongo en presencia de fenilacetato (para su uso como sonda "más" en el rastreo de la genoteca).

La cepa de *A. nidulans* A26 de la colección Fungal Genetics Stock Center (Departamento de Microbiología, Centro Médico de la Universidad de Kansas) se cultivó a 37° C

35

- 11 -

en medio mínimo adecuadamente suplementado que contenía (en g/l) KPO_4H_2 , (13,6), $(NH_4)_2SO_4$, 2,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,25 y $Fe \times 7H_2O$, 0,0005, con glucosa al 0,3 % (p/v) como fuente de carbono. El momento en que se consumió la glucosa se determinó
5 analizando la concentración de glucosa en el medio de cultivo (utilizando un "kit" enzimático). Esto ocurrió generalmente a las 18 horas de incubación con agitación constante. Dos horas después se añadió fenilacetato al cultivo, hasta una concentración final de 10 mM y el cultivo se
10 agitó a 37°C durante 1 hora más con el fin de inducir la expresión de los genes mencionados. Después de este tiempo, se recogió el micelio por filtración, se lavó con agua, se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó y se usó para aislar ARN total. Esta preparación de ARN total se usó para
15 aislar mRNA poli(A') mediante cromatografía de afinidad en oligo-dT celulosa. Se preparó cADN monocatenario en presencia de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (de origen comercial), utilizando como molde 2 µg de dicho mRNA aislado de micelio inducido con fenilacetato y
20 oligo-dT (15-mer) como iniciador. La reacción se incubó durante 1 hora a 42°C en un tampón que contenía 10 mM Tris-HCl pH 8,8 (a 25°C), 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM de cada dNTP y 0,5 unidades de ARNsin. Tras la síntesis de la primera cadena, se eliminó el ARN molde
25 mediante incubación durante 1 hora a 60°C con NaOH 3M. Después de la neutralización (con ácido acético), el ADN monocatenario se recuperó por centrifugación mediante precipitación con 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante 2 horas a -80°C. Este cADN se sustrajo con un exceso de 30 veces de
30 ARN poli(A') aislado del micelio recogido en el momento del agotamiento de la glucosa, siguiendo el procedimiento descrito por Sargent, T.D., Methods Enzymol. 152: 423-432, 1.987. Las moléculas híbridas cADN-ARN se separaron por cromatografía en hidroxapatito a 68°C y se desecharon. El
35 cADN restante se hibridó como se ha mencionado, con un exceso de ARN poli(A') procedente de micelio cultivado en ausencia de fenilacetato. De nuevo se desecharon las mo-

- 12 -

léculas híbridas cADN-ARN como se ha indicado y se recogió la población de cADN monocatenario resultante, la cual representaba transcritos de genes expresados preferentemente en presencia de fenilacetato. Este cADN fue marcado
5 uniformemente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ y exceso de todos los demás dNTPs, en presencia del fragmento Klenow de la ADN polimerasa y hexanucleótidos de secuencia aleatoria como "primers". La población obtenida de cADNs marcados con ^{32}P (actividad específica $> 10^8$ cpm/mg) se usó como sonda para
10 rastrear una genoteca de cADN construida como se describe en el apartado c).

b) Obtención de una sonda de cADN correspondiente a genes transcritos en ausencia de fenilacetato (sonda "menos").

15 Se sintetizó cADN monocatenario y se marcó con ^{32}P como se describe en el apartado a), pero usando mRNA procedente de micelio cultivado hasta el agotamiento de la glucosa del medio de cultivo e incubado durante 1 hora más a 37°C en ausencia de fenilacetato.

20

c) Construcción de una genoteca de cADN en el vector $\lambda\text{gt}10$, usando cADN obtenido de micelio cultivado en presencia de 10 mM de fenilacetato como única fuente de carbono.

Para construir esta genoteca se realizó la reacción de
25 síntesis de la primera cadena de cADN tal y como se describe anteriormente. El híbrido cADN-ARN obtenido se convirtió en cADN de doble cadena introduciendo roturas aleatorias en la cadena de ARN con ARNasa H, las cuales se utilizaron como puntos iniciadores por la ADN polimerasa I de
30 *Escherichia coli*. Para añadir extremos *EcoRI* a este preparado como de cADN, se incubaron adaptadores sintéticos que contenían el extremo fosforilado como y el saliente *EcoRI* con el cADN de doble cadena en presencia de T4 ADN ligasa. A continuación, se purificaron los cADNs de extremo *EcoRI* y
35 se fosforilaron con T4 polinucleótido quinasa y ATP. El cADN fosforilado se mezcló con los brazos del vector $\lambda\text{gt}10$

- 13 -

previamente digeridos con *EcoRI* y desfosforilados y la mezcla se incubó con T4 ADN ligasa. Las moléculas de ADN recombinante se empaquetaron in vitro, utilizando extractos de empaquetamiento comerciales. Los fagos recombinantes en los que un inserto de cADN había inactivado el gen *cI* (en el cual está presente el sitio *EcoRI*) se seleccionaron por su fenotipo lítico en una cepa de *E. coli hfl* (*F-*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, *hflA150*, [chr::Tn10]). De esta forma se obtuvieron un total de 10⁷ clones recombinantes.

d) Rastreo de la genoteca.

La genoteca de cADN se plaqueó utilizando la cepa *E. coli C600 hfl* y las placas de lisis obtenidas fueron transferidas por duplicado a filtros de nitrocelulosa. Una de las réplicas fue hibridada con la sonda cADN "más" (descrita en a)) y la segunda réplica se hibridó con la sonda cADN "menos" (descrita en b)). Seguidamente se seleccionaron y purificaron los clones que hibridaron con la sonda "más" y no hibridaron con la sonda "menos".

e) Identificación del cADN correspondiente al gen *phacA*.

Los insertos de cADN se escindieron del vector mediante digestión con la endonucleasa *NotI*, utilizando los sitios de corte *NotI* incluidos en el adaptador *EcoRI*. Los insertos de los clones seleccionados fueron subclonados en plásmido pBluescript SK(+) digerido con *NotI* y seguidamente fueron secuenciados por procedimientos estándar. Las secuencias de los insertos de cADN fueron traducidos en los seis posibles de marcos de lectura y se compararon usando el algoritmo BLAST con la traducción conceptual en los seis marcos de lectura de las bases de datos de secuencia de ADN de acceso público GenBank y EMBL o con las bases de datos de secuencia de proteína SwissProt y PIR. Una de las secuencias de los insertos de cADN generó un extenso marco de

- 14 -

lectura abierto, no interrumpido por codones de terminación. La secuencia de aminoácidos deducida mostró una identidad significativa con secuencias de aminoácidos de las proteínas de la familia del citocromo P450, las cuales
5 intervienen generalmente en reacciones de oxidación. Como se demostrará más adelante (véase el Ejemplo 3), el marco de lectura abierto codifica para una fenilacetato 2-hidroxilasa. Este inserto de cADN se utilizó para obtener por hibridación nuevos clones de cADN correspondientes a este
10 gen. Estos clones se secuenciaron por ambas cadenas y la secuencia de nucleótidos obtenida mostró un marco de lectura abierto completo de 1.554 pb de longitud (sin el codón de terminación de la traducción) que codifica para un polipéptido de 518 aminoácidos (SEQ ID NO: 2). La identidad
15 de esta secuencia con miembros de la familia de las proteínas citocromo P450 estableció sin ambigüedad que esta proteína deducida representa un nuevo miembro de esta familia.

20 f) Clonación del gen *phacA*.

Una genoteca de ADN genómico de *A. nidulans* construida en el vector λ EMBL4 se rastreó con una sonda de cADN marcada con 32 P correspondiente al transcrito casi completo. Se purificaron los clones positivos y sus insertos fueron
25 caracterizados mediante digestión con enzimas de restricción e hibridación con la sonda anteriormente mencionada. De esta forma se mapeó la zona de hibridación de dos fragmentos contiguos *BamHI* de 2,4 y 1,9 kb de longitud. En la Fig. 4 se muestra un mapa de restricción de la región genómica que contiene estos fragmentos. Dichos fragmentos *BamHI*
30 se subclonaron en pBluescript SK(+). El plásmido recombinante que contenía el fragmento *BamHI* de 2,4 kb se designó pBS-FG4A, mientras que el plásmido que portaba el fragmento *BamHI* de 1,9 kb se designó pBS-FG4B.

- 15 -

EJEMPLO 2. CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN *pahA* DE *P. chrysogenum*, HOMOLOGO FUNCIONAL DEL GEN *phacA* DE *A. nidulans*.

- 5 a) Clonación y determinación de la secuencia de nucleótidos del gen *pahA* de *P. chrysogenum*.

Una genoteca genómica de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, construida con fragmentos parciales Sau3A clonados en el sitio *BamHI* de λ EMBL4, fue rastreada con una sonda
10 marcada radiactivamente (con ^{32}P) consistente en un cADN de longitud casi completa del gen *phacA*. Alrededor de 12.000 clones fueron transferidos a filtros de celulosa por medio de técnicas estándar. Seguidamente se hibridaron durante 24 h a 37°C en un tampón que contenía 50 % de formamida, 5 x
15 solución de Denhart, 5 x SSC, 0,1 % de SDS, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN monocatenario de esperma de arenque sonificado y 50 ng de la sonda marcada. El lavado final de los filtros hibridados se realizó en 0,2 x SSC, 0,1 % SDS a 37°C. Mediante este procedimiento se purificaron 10 clones y su ADN fue aisla-
20 do. Seguidamente los insertos de dichos clones fueron caracterizados mediante digestión con enzimas de restricción e hibridación con la sonda antedicha. La región de hibridación se localizó en un fragmento *XhoI* de 2,55 kb, cuyo mapa de restricción se muestra en la Fig. 5. Este fragmento de ADN se subclonó en el plásmido pBluescript SK(+) dando
25 lugar al plásmido denominado pALP520. La secuencia nucleotídica del fragmento *XhoI* que incluía el gen *pahA* (Fig. 5) se determinó por el método del didesoxinucleótido (Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1.977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467).
30

- b) Construcción de una genoteca de cADN de *P. chrysogenum* a partir de ARN purificado en condiciones de producción de penicilina. Caracterización del cADN correspondiente al gen
35 *pahA*.

- 16 -

El micelio procedente de cultivos en fermentador de una cepa industrial de *P. chrysogenum*, cultivada en condiciones de producción de penicilina G, se recogió a las 100, 124 y 148 horas de incubación y se utilizó para obtener
5 mRNA poli(A⁺) con el "Poly (A) Quick mRNA Purification Kit" (Stratagene). Este poli(A⁺) mRNA se utilizó como molde para la construcción de una genoteca de cADN utilizando el "ZAP-cDNA Synthesis Kit" (Stratagene) según las recomendaciones del fabricante. El cADN de doble cadena se insertó entre
10 los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* del vector fágico λZAP, situando la región 5' de los transcritos al lado del sitio *EcoRI*. La genoteca fue empaquetada con extractos de empaquetamiento "Gigapack II Gold" (Stratagene) generando alrededor de 10⁵ clones independientes.

15 El rastreo de esta genoteca de cADN se realizó conforme a procedimientos estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1.989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York), utilizando como sonda un fragmento *EcoRV* de 1.174 pb
20 interno al gen *pahA* (Figura 5). De esta forma se aislaron doce clones recombinantes positivos, (denominados desde #1 hasta #12) y se eligió para su caracterización el clon con el inserto de mayor tamaño (aproximadamente 1.600 pb). Seguidamente se determinó la secuencia de nucleótidos completa de este clon, observando que incluía un marco abierto
25 de lectura (ORF) de 1.548 pb, el cual codifica para un polipéptido de 516 aminoácidos con un peso molecular de 58.112 Da y una identidad del 84 % con la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *phacA* de *A. nidulans*. Como ocurría con su gen homólogo de *A. nidulans*,
30 la investigación de las bases de datos mostró una identidad considerable de la proteína *PahA* con miembros de la familia de proteínas P450. La proteína *PahA* contiene la secuencia Gly-X-Gly-X-X-X-Cys-X-Gly (residuos 430-438, SEQ ID NO:4)
35 que caracteriza este tipo de proteínas (véase la Descripción

- 17 -

ción Detallada de esta invención). De estos resultados se concluye que el gen *pahA* de *P. chrysogenum* es el homólogo del gen *phacA* de *A. nidulans*.

5 EJEMPLO 3. INACTIVACION DEL GEN *phacA* DE *A. nidulans* MEDIANTE GENETICA INVERSA.

El alelo silvestre del gen *phacA* de *A. nidulans* fue sustituido por un alelo mutado, en el cual se había supri-
10 mido parte de su región codificante, presumiblemente esencial para su función (residuos 298 a 392 en SEQ ID NO:1), siendo sustituida por el gen *argB*⁺. Por lo tanto, esta manipulación genética trunca el gen *phacA* en el codón 297 generando un alelo mutado nulo.

15 Por otra parte, se purificó un fragmento *KpnI-EcoRI* de 1,7 kb, a partir de pBS-FG4B (Figura 4) y se subclonó en pUC18 digerido con estas dos enzimas, originando el plásmido pUCB. Seguidamente, se purificó un fragmento *NaeI* de 1,9 kb a partir de pBS-FG4A (Figura 4) y se clonó en
20 pBluescript SK(+) digerido con *SmaI*. Se seleccionó un plásmido en el que la cadena codificante del gen *phacA* incompleto (comenzando en el sitio *NaeI*) se encontraba en la misma orientación que el gen que codifica para β -galactosidasa en el vector. Este plásmido fue denominado pBSA.
25 Se purificó un fragmento de ADN de *XbaI-HindIII* a partir de pBSA y se insertó en pUCB digerido con *XbaI-HindIII*, originando el plásmido pUCA-B. Finalmente, se insertó un fragmento de ADN de 3,2 kb, que contenía el gen *argB*⁺ de *A. nidulans* en el único sitio *XbaI* de pUCA-B, para dar
30 pPhacA::*argB*⁺. Comenzando a partir del promotor *lacZ* de pUC18, pPhacA::*argB* incluye un fragmento de 0,94 kb de la región 5' del gen *phacA*, seguido secuencialmente por los primeros 297 codones de su secuencia genómica, el fragmento de 3,2 kb que contiene el gen *argB*, la secuencia genómica

- 18 -

del gen *phacA* correspondiente a los codones 393-518 y 1,2 kb de la región 3' del gen *phacA*. Un fragmento lineal que contenga todas estas regiones puede purificarse a partir del plásmido mediante digestión *EcoRI* (Figura 6).

5 Asimismo, se puede construir por transformación una cepa de *A. nidulans* que incluya una mutación de disrupción-delección en el gen *phacA* utilizando este fragmento lineal de *EcoRI* y siguiendo la estrategia resumida en esquema descrito anteriormente. Para ello, se transformaron protoplastos de
10 la cepa de *A. nidulans* *bia1*, *methG1*, *argB2*, con 2 µg de dicho fragmento de ADN, utilizando el protocolo de Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. y Davies, R.W. (1.983) *Gene* 26: 205-211. Los transformantes se seleccionaron por prototrofia de
15 arginina usando un medio selectivo apropiado y seguidamente se purificaron. Se aisló ADN del micelio correspondiente a una serie de transformantes, se digirió con *PstI* y se analizó por hibridación de Southern, utilizando sondas específicas de los genes *phacA* y *argB*. Varios transformantes mos-
20 traron el patrón de hibridación esperado para el suceso de doble entrecruzamiento que se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, usando como sonda el fragmento *PstI* de 0,9 kb del gen *phacA* (véase la Fig. 4), se comprobó que la banda de hibridación individual *PstI* de 0,9 kb de la cepa receptora
25 había sido sustituida por una banda de 3,8 kb en los transformantes que presentaban el tipo de integración que se muestra en la Figura 1. Esta banda también hibridó con la sonda *argB*. Dos de estos transformantes se eligieron para su posterior caracterización y fueron designados Δ *phacA* #1 y
30 Δ *phacA* #2. Estas cepas transformadas poseían capacidad para crecer en medios de cultivo con fenilalanina, 2-hidroxifenilacetato o 2,5-dihidroxifenilacetato como única fuente de carbono, pero por el contrario, no crecían en medios de cultivo con fenilacetato como única fuente de carbono. Esto

- 19 -

respalda la conclusión de que la enzima citocromo P450 codificada por el gen *phacA* de *A. nidulans* (y por extensión la codificada por el gen *pahA* de *P. chrysogenum*) posee una actividad que hidroxila fenilacetato a 2-hidroxifenilacetato, catalizando esta actividad el primer paso de la vía de utilización de fenilacetato en *A. nidulans* (ver Estado de la Técnica). La cepa de *A. nidulans* Δ *phacA* #1, que era fenotípicamente indistinguible de la cepa Δ *phacA* #2, se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100, Valencia, con fecha 19 de Junio de 1996, como *A. nidulans* *biA1 veA1 methG1 argB2 phacA* :: [p*PhacA* :: *argB*] con el número de acceso CECT 20195. La obtención de transformantes de *P. chrysogenum* con el gen *pahA* inactivado es muy evidente para cualquier experto en el arte. Simplemente consistiría en aislar el gen *pahA* de *P. chrysogenum* por hibridación con el con el gen *phacA* de *A. nidulans* presente en el transformante CECT 20195 o alternativamente mediante hibridación con oligonucleótidos sintéticos basados en SEQ ID No:1. Posteriormente y utilizando el plásmido pALfleo7 (depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Valencia, con fecha 20 de Febrero de 1997, como CECT 4849) se construiría el plásmido pALP696 tal y como se indica en la figura 7 de la presente patente.

EJEMPLO 4. ENSAYO DE LA INACTIVACION DE LA FUNCION DEL GEN *phacA* Y DEL INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE PENICILINA.

30

Para comprobar si eliminando la actividad fenilacetato 2-hidroxilasa codificada por el gen *phacA* se conseguía una producción de penicilina mejorada, se realizaron experimentos para medir los niveles de penicilina producidos por la

- 20 -

cepa *ΔphacA* en comparación con una cepa *phacA*⁺. Ambas cepas fueron comparadas mediante fermentación en matraz en un medio mínimo que contenía 2,5 % (p/v) de lactosa como principal fuente de carbono y 2,5 % (p/v) de corn steep sólido, con diferentes cantidades de fenilacetato sódico (en p/v) según se indica. Los cultivos se inocularon en todos los casos con igual número de conidiosporas viables (2×10^6 /ml) y se incubaron a 37°C con agitación orbital (250 r.p.m.). Se tomaron muestras a diferentes tiempos, se filtraron a través de Miracloth y los sobrenadantes se utilizaron para medir por bioensayo la penicilina producida.

Para el bioensayo se mezcló 1 ml de un cultivo de *Micrococcus luteus* crecido hasta una $DO^{600} = 6$ con 1 l del medio Antibiotic N° 1 (Difco) a 50°C. Esta mezcla se vertió en placas Petri de 13,6 cm (65 ml/placa). En pocillos de 8 mm de diámetro se dispusieron muestras de 100 μ l correspondientes a los sobrenadantes de los cultivos (adecuadamente diluidas en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 6,8). Las placas se incubaron durante 2 horas a 4°C y a continuación durante otras 22 h a 37°C. Posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano originados por la penicilina presente en las muestras y se estimó la cantidad de antibiótico comparando con una recta de calibración realizada con diferentes cantidades de penicilina G potásica.

La Figura 3 muestra que los niveles más altos de penicilina correspondientes a la cepa control *phacA*⁺ se obtuvieron a las 24 horas utilizando un 0,125 % de fenilacetato en el medio de producción. El nivel de producción alcanzado a este tiempo fue de 1,8 μ g/ml penicilina. La disminución a la mitad de la concentración de fenilacetato redujo los niveles máximos de penicilina producidos por esta cepa a 1,1 μ g/ml.

La Figura 3 también muestra que, en marcado contraste, los niveles más altos de penicilina en un cultivo de la

- 21 -

cepa $\Delta phacA$ alcanzaron 5,6 $\mu\text{g/ml}$, es decir, niveles 3,1 veces más altos que los de su cepa parental. Además, como resultado de la inactivación del gen *phacA*, el incremento de producción de penicilina no se vio afectado por la
5 reducción de la concentración inicial de fenilacetato al 0,0625 %.

Se concluye que una mutación de disrupción-delección del gen *phacA* que codifica una actividad fenilacetato 2-hidroxilasa, realizada por medio de técnicas de genética
10 inversa como se esquematiza en la Figura 1, origina al menos dos ventajas en la producción de penicilina por *A. nidulans*: (i) los niveles de penicilina se elevan considerablemente y (ii) la producción de penicilina depende en menor grado del suministro externo de fenilacetato.

15

Descripción detallada de las figuras.

Figura 1: Estrategia usada para generar una mutación de disrupción-delección en el gen *phacA* de *A. nidulans* mediante
20 recombinación homóloga. Los supuestos entrecruzamientos se muestran con cruces grandes en negrita.

Figura 2: Estrategia usada para generar una mutación de disrupción-delección en el gen *pahA* de *P. chrysogenum* mediante recombinación homóloga. Los supuestos entrecruzamientos se muestran con cruces grandes discontinuas.
25

Figura 3. Producción de penicilina de una cepa transformada *phacA::argB* de *A. nidulans* en comparación con una cepa de tipo silvestre (*phacA*⁺). Abscisas: tiempo en horas (h); Ordenadas: producción de penicilina ($\mu\text{g/ml}$). Línea continua: Concentración de fenilacetato de 0.125%; Línea discontinua : Concentración de fenilacetato de 0.0625%.
30

Figura 4: Mapa de restricción de la región genómica que incluye el gen *phacA* de *A. nidulans*, mostrando los fragmentos que fueron subclonados para generar pFG4A y pFG4B. En trazo
35 oscuro los 3 intrones.

- 22 -

Figura 5: Mapa de restricción de la región genómica que incluye el gen *pahA* de *P. chrysogenum*, mostrando el fragmento *XhoI* de 2,55 kb que fue subclonado para generar pALP520. En trazo más oscuro los 3 intrones.

- 5 Figura 6: Mapa de restricción y características relevantes de la construcción de inactivación pPhacA::*argB*^r. En trazo oscuro la región de secuenciación que incluye el gen *phacA*; En trazo blanco las zonas flanqueantes anterior y posterior al gen *phacA*; En trazo rayado la región *argB*^r.
- 10 Figura 7: Mapa de restricción y características relevantes de la construcción de inactivación pALP696. En trazo oscuro la región de secuenciación que incluye el gen *pahA* (1.745 pb); En trazo blanco las zonas flanqueantes anterior y posterior al gen *pahA* (4.143 pb); En trazo rayado la región de
- 15 resistencia a bleomicina, gen *ble*^R (2.048 pb).

LISTADO DE SECUENCIAS

INFORMACION GENERAL:

SOLICITANTE:

NOMBRE: ANTIBIOTICOS, S.A.U.
CALLE: Avda. de Burgos, 8-A
CIUDAD: Madrid
ESTADO O PROVINCIA: Madrid
PAIS: España
CODIGO POSTAL: 28036
TELEFONO: 91-3841200
FACSIMIL: 91-3841220

TITULO: "PROCEDIMIENTO DE INACTIVACION DE GENES QUE
CODIFICAN PARA ENZIMAS DEL CATABOLISMO DEL
FENILACETATO, PLASMIDOS QUE INTERVIENEN Y
CEPAS TRANSFORMADAS CON LOS MISMOS".

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:

DESTINATARIO: ANTIBIOTICOS, S.A.U.
CALLE: Avda. de Burgos, 8-A
CIUDAD: Madrid
ESTADO O PROVINCIA: Madrid
PAIS: España
CODIGO POSTAL: 28036

FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE MEDIO: DISCO 3.5"
ORDENADOR: PC
SISTEMA OPERATIVO: WINDOWS
SOPORTE LOGICO: WORD

- 24 -

INFORMACION SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

NOMBRE: ALBERTO DE ELZABURU
 NUMERO DE REGISTRO: 232/1
 NUMERO DE REFERENCIA/REGISTRO: PCT-42

INFORMACION SOBRE TELECOMUNICACIONES:

TELEFONO: 91 7009400
 FACSIMIL: 91 3193810
 TELEX O CORREO ELECTRONICO: elzaburu@elzaburu.es

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 1

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 1986 pares de bases
 TIPO: nucléotidos
 NÚMERO DE HEBRAS: 2
 CONFIGURACIÓN: lineal
 TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
 HIPOTETICA: NO
 ANTI-SENTIDO: NO
 FUENTE DE ORIGEN: Aspergillus nidulans
 FUENTE INMEDIATA: plásmido pPhacA::argB⁺
 POSICION EN EL GENOMA: desconocida
 CARACTERÍSTICA:
 NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante
 SITUACIÓN: 82..1810
 OTRAS INFORMACIONES: gen phacA

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

	C CAGCCAGATA TAAAGGCCGT	21
CCTTAGACGA CTTGATCTTA CTCTGGTTTC TAAAAGTTCA CTGATTATCG CAAGGTATCC		81
ATG TCT CTT CAA ACA ATC GGG ATC GCC GCT GTC GCG GTG GTC TAT TTT		129
Met Ser Leu Gln Thr Ile Gly Ile Ala Ala Val Ala Val Val Tyr Phe		

CTC ATC CGC TAC TTC AAC CGC ACA GAC ATC CCA AAG ATC AAG GGT CTC 177
 Leu Ile Arg Tyr Phe Asn Arg Thr Asp Ile Pro Lys Ile Lys Gly Leu
 20 25 30

CCT GAA GTT CCA GGC GTA CCG ATC TTT GGC AAC CTC ATC CAG CTC GGT 225
 Pro Glu Val Pro Gly Val Pro Ile Phe Gly Asn Leu Ile Gln Leu Gly
 35 40 45

GAC CAG CAC GCG ACC GTA GCG CAG AAA TGG GCG AAG AAA TTT GGA CCT 273
 Asp Gln His Ala Thr Val Ala Gln Lys Trp Ala Lys Lys Phe Gly Pro
 50 55 60

GTT TTC CAG GTT CGC ATG GGG AAT AAA GTGAGTTCAG TGTCTGCATT TGTAAC 326
 Val Phe Gln Val Arg Met Gly Asn Lys
 65 70

AGAC GACAATATTG CGAGAATAAT TCTGACCTAA CACAG CGC GTT GTC TTC GCA 380
 Arg Val Val Phe Ala
 75

AAC ACC TTC GAC TCT GTC CGT CAG CTA TGG ATC AAA GAT CAG TCC GCG 428
 Asn Thr Phe Asp Ser Val Arg Gln Leu Trp Ile Lys Asp Gln Ser Ala
 80 85 90

CTC ATC TCC CGG CCG ACC TTT CAC ACC TTC CAC AGT GTA GTT TCC AGC 476
 Leu Ile Ser Arg Pro Thr Phe His Thr Phe His Ser Val Val Ser Ser
 95 100 105 110

TCT CAG GGA TTC ACC ATC GGA ACG TCG CCG TGG GAC GAG TCG TGC AAG 524
 Ser Gln Gly Phe Thr Ile Gly Thr Ser Pro Trp Asp Glu Ser Cys Lys
 115 120 125

CGT CGT CGG AAG GCT GCA GCT ACA GCC TTG AAC CGC CCG GCT ACC CAG 572
 Arg Arg Arg Lys Ala Ala Ala Thr Ala Leu Asn Arg Pro Ala Thr Gln
 130 135 140

TCG TAT ATG CCT ATT ATC GAT CTT GAG TCG ATG TCG AGT ATC CGG GAA 620
 Ser Tyr Met Pro Ile Ile Asp Leu Glu Ser Met Ser Ser Ile Arg Glu
 145 150 155

TTG CTC AGG GAT AGC GCG AAT GGA ACA ATG GAT ATC AAC CCG ACA GCG 668
 Leu Leu Arg Asp Ser Ala Asn Gly Thr Met Asp Ile Asn Pro Thr Ala
 160 165 170

TAC TTC CAG CGG TTC GCG TTG AAC ACG AGC TTA ACA TTG AAC TAT GGA 716
 Tyr Phe Gln Arg Phe Ala Leu Asn Thr Ser Leu Thr Leu Asn Tyr Gly
 175 180 185 190

ATC CGA ATC GAG GGC AAT GTG AAC GAT GAG CTT TTG CGC GAA ATT GTC	764
Ile Arg Ile Glu Gly Asn Val Asn Asp Glu Leu Leu Arg Glu Ile Val	
195 200 205	
GAT GTC GAG CGC GGG GTG TCG AAC TTC CGG AGT ACC AGC AAC CAG TGG	812
Asp Val Glu Arg Gly Val Ser Asn Phe Arg Ser Thr Ser Asn Gln Trp	
210 215 220	
CAG GAC TAT ATC CCG CTC CTG AGA ATC TTC CCG AAG ATG AAC CGC GAG	860
Gln Asp Tyr Ile Pro Leu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Met Asn Arg Glu	
225 230 235	
GCT GAG GAG TTC CGG GTG CGG AGA GAC AAG TAT CTT ACC TAT CTT TTG	908
Ala Glu Glu Phe Arg Val Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Thr Tyr Leu Leu	
240 245 250	
GAT GTT CTC AAG GAT CGC ATT GCA AAG GGA ACC GAC AAG CCC TGT ATT	956
Asp Val Leu Lys Asp Arg Ile Ala Lys Gly Thr Asp Lys Pro Cys Ile	
255 260 265 270	
ACT GGA AAC ATC CTC AAA GAC CCT GAG GCT AAG CTC AAT GAT G GTATG	1004
Thr Gly Asn Ile Leu Lys Asp Pro Glu Ala Lys Leu Asn Asp	
275 280	
CCGTC CGGTCCTGTC CGCGCTTGAA GGAAAATAAA GATTAACAGA GTCTAG CC GAG	1060
Ala Glu	
285	
ATT AAA TCG ATC TGC TTG ACC ATG GTC TCC GCC GGC CTC GAT ACT GTT	1108
Ile Lys Ser Ile Cys Leu Thr Met Val Ser Ala Gly Leu Asp Thr Val	
290 295 300	
CCG GGC AAC TTG ATC ATG GGC ATC GCG TAC CTC GCC TCC GAA GAC GGC	1156
Pro Gly Asn Leu Ile Met Gly Ile Ala Tyr Leu Ala Ser Glu Asp Gly	
305 310 315	
CAA AGG ATC CAG AAG CGC GCC CAC GAC GAG ATC ATG AAA GTC TAC CCG	1204
Gln Arg Ile Gln Lys Arg Ala His Asp Glu Ile Met Lys Val Tyr Pro	
320 325 330	
GAC GGC GAT GCA TGG GAG AAA TGC CTG CTC GAA GAG AAA GTC CCC TAC	1252
Asp Gly Asp Ala Trp Glu Lys Cys Leu Leu Glu Glu Lys Val Pro Tyr	
335 340 345 350	
GTC ACA GCT TTG GTC AAA GAA ACC CTC CGC TTC TGG ACT GTC ATT CCC	1300
Val Thr Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Arg Phe Trp Thr Val Ile Pro	
355 360 365	

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 2

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 518 aminoácidos

TIPO: aminoácidos

NÚMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE DE ORIGEN: Aspergillus nidulans

CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: secuencia de aminoácidos del
enzima fenilacetato 2 hidroxilasa

CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: Peso molecular 58495 Da.

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 2

Met	Ser	Leu	Gln	Thr	Ile	Gly	Ile	Ala	Ala	Val	Ala	Val	Val	Tyr
				5					10					15
Phe	Leu	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asn	Arg	Thr	Asp	Ile	Pro	Lys	Ile	Lys
				20					25					30
Gly	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Gly	Val	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Leu	Ile
				35					40					45
Gln	Leu	Gly	Asp	Gln	His	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Lys	Trp	Ala	Lys
				50					55					60
Lys	Phe	Gly	Pro	Val	Phe	Gln	Val	Arg	Met	Gly	Asn	Lys	Arg	Val
				65					70					75
Val	Phe	Ala	Asn	Thr	Phe	Asp	Ser	Val	Arg	Gln	Leu	Trp	Ile	Lys
				80					85					90
Asp	Gln	Ser	Ala	Leu	Ile	Ser	Arg	Pro	Thr	Phe	His	Thr	Phe	His
				95					100					105
Ser	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Phe	Thr	Ile	Gly	Thr	Ser	Pro
				110					115					120
Trp	Asp	Glu	Ser	Cys	Lys	Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala
				125					130					135
Leu	Asn	Arg	Pro	Ala	Thr	Gln	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Ile	Asp	Leu
				140					145					150
Glu	Ser	Met	Ser	Ser	Ile	Arg	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	Ala	Asn
				155					160					165
Gly	Thr	Met	Asp	Ile	Asn	Pro	Thr	Ala	Tyr	Phe	Gln	Arg	Phe	Ala
				170					175					180
Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Asn	Tyr	Gly	Ile	Arg	Ile	Glu	Gly
				185					190					195
Asn	Val	Asn	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Val	Asp	Val	Glu	Arg
				200					205					210

- 29 -

Gly Val Ser Asn Phe Arg Ser Thr Ser Asn Gln Trp Gln Asp Tyr		
	215	220 225
Ile Pro Leu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Met Asn Arg Glu Ala Glu		
	230	235 240
Glu Phe Arg Val Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Thr Tyr Leu Leu Asp		
	245	250 255
Val Leu Lys Asp Arg Ile Ala Lys Gly Thr Asp Lys Pro Cys Ile		
	260	265 270
Thr Gly Asn Ile Leu Lys Asp Pro Glu Ala Lys Leu Asn Asp Ala		
	275	280 285
Glu Ile Lys Ser Ile Cys Leu Thr Met Val Ser Ala Gly Leu Asp		
	290	295 300
Thr Val Pro Gly Asn Leu Ile Met Gly Ile Ala Tyr Leu Ala Ser		
	305	310 315
Glu Asp Gly Gln Arg Ile Gln Lys Arg Ala His Asp Glu Ile Met		
	320	325 330
Lys Val Tyr Pro Asp Gly Asp Ala Trp Glu Lys Cys Leu Leu Glu		
	335	340 345
Glu Lys Val Pro Tyr Val Thr Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Arg		
	350	355 360
Phe Trp Thr Val Ile Pro Ile Cys Leu Pro Arg Glu Asn Thr Lys		
	365	370 375
Asp Ile Val Trp Asn Gly Ala Val Ile Pro Lys Gly Thr Thr Phe		
	380	385 390
Phe Met Asn Ala Tyr Ala Ala Asp Tyr Asp Glu Thr His Phe Thr		
	395	400 405
Asn Pro His Ala Phe Glu Pro Glu Arg Tyr Leu Thr Ala Ser Ser		
	410	415 420
Asp-Gly Ser Gly Thr Pro His Tyr Gly Tyr Gly Ala Gly Ser Arg		
	425	430 435
Met Cys Ala Gly Ser His Leu Ala Asn Arg Glu Leu Phe Thr Ala		
	440	445 450
Tyr Val Arg Leu Ile Thr Ala Phe Thr Met His Pro Ala Lys Arg		
	455	460 465
Ala Glu Asp Arg Pro Ile Leu Asp Ala Ile Glu Cys Asn Ala Ile		
	470	475 480
Pro Thr Ala Leu Thr Thr Glu Pro Lys Pro Phe Lys Val Gly Phe		
	485	490 495
Lys Pro Arg Asp Pro Val Leu Val Arg Lys Trp Ile Ala Glu Ser		
	500	505 510
Glu Glu Arg Thr Lys His Leu Asn		
	515	

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 3

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2558 pares de bases

TIPO: nucléotidos

NÚMERO DE HEBRAS: 2

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

HIPOTETICA: NO
 ANTI-SENTIDO: NO
 FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum
 FUENTE INMEDIATA: plásmido pALP520
 POSICION EN EL GENOMA: desconocida
 CARACTERÍSTICA:
 NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante
 SITUACIÓN: 371..2094
 CARACTERISTICA:
 OTRAS INFORMACIONES: gen pahA

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 3

CTCGAGAAGG	TCTGTTGACA	CGAGTCCACA	AGATGTTGCG	AAGTATATAA	TATGAGAAAT	60
GGATATAACAG	CGGAAAATTG	AAGTTTCATT	CCGCGGGGGC	GGGGAACAAG	AGGAAGCGCG	120
GAATGAACAT	TCCGTCTATG	CGCGGTGGAG	AGATCTTCGA	ACTGGGGACT	TGTGGACTTG	180
GACCTATGAG	AGAGCTGCCT	TACTGATTC	TGGGACTTGT	GGCCAATGAA	ACATGTCATG	240
GATGTTACAG	CTTTCTTTAT	GCGACTCTCT	AAACTCGGAA	ATATGCCGTA	GCCGAAATGC	300
AGGAAAGGCT	GGGCTATAAG	AGATGCATGC	TCCCACCGAA	CGTCTGCAAT	TCCTTGTTTC	360
ACTCTATATC	ATG GCC ATC	CAA ACA CTC	GCA GTC GCC	GTG ATC ACG	GTG GTC	412
	Met Ala Ile	Gln Thr Leu	Ala Val Ala	Val Ile Thr	Val Val	
		5		10		
TAT TTC GTC	ATT CGA TAC	TTC AAC CGC	ACT GAT ATC	CCT AAG ATT	AAA	460
Tyr Phe Val	Ile Arg Tyr	Phe Asn Arg	Thr Asp Ile	Pro Lys Ile	Lys	
15		20		25	30	
GGC CTC CCG	GAG ATT CCT	GGT ATA CCC	ATA TTT GGC	AAT CTA TTG	CAG	508
Gly Leu Pro	Glu Ile Pro	Gly Ile Pro	Ile Phe Gly	Asn Leu Leu	Gln	
	35		40		45	
CTA GGA GAT	CAA CAT GCC	ACA GTC ACG	GGG AAA TGG	GCA AAG AAA	TTT	556
Leu Gly Asp	Gln His Ala	Thr Val Thr	Gly Lys Trp	Ala Lys Lys	Phe	
	50		55		60	
GGC CCA GTT	TTC CAA GTG	CGC ATG GGA	AAC AAG GTA	AAGTAATC	AAATAATCTT	609
Gly Pro Val	Phe Gln Val	Arg Met Gly	Asn Lys			
	65		70			

TTAAATCGGA CATTCTGATA ATCTAATGCC CTTTTAG CGC ATC GTG TTC GCC AAC 664
 Arg Ile Val Phe Ala Asn
 75

GGC TTT GAC TCC GTT CGT CAA TTG TGG ATT AAG GAC TCG TCG GCT CTG 712
 Gly Phe Asp Ser Val Arg Gln Leu Trp Ile Lys Asp Ser Ser Ala Leu
 80 85 90 95

ATC TCC CGC CCA ACT TTC CAC ACT TTC CAC AGC GTC GTC TCC AGT TCA 760
 Ile Ser Arg Pro Thr Phe His Thr Phe His Ser Val Val Ser Ser Ser
 100 105 110

CAG GGC TTC ACG ATC GGA ACT TCC CCG TGG GAT GAT TCC TGT AAG AAA 808
 Gln Gly Phe Thr Ile Gly Thr Ser Pro Trp Asp Asp Ser Cys Lys Lys
 115 120 125

CGT CGC AAG GCA GCT GCC ACT GCG CTG AAT CGA CCG GCC GTG CAA TCG 856
 Arg Arg Lys Ala Ala Ala Thr Ala Leu Asn Arg Pro Ala Val Gln Ser
 130 135 140

TAT ATG CCC ATC ATC GAT CTT GAA TCC AAT TCC AGC ATC AAA GAA CTG 904
 Tyr Met Pro Ile Ile Asp Leu Glu Ser Asn Ser Ser Ile Lys Glu Leu
 145 150 155

TAC CGG GAC AGC CAA AAT GGC AAA CGT GAT GTG AAT CCC ACT GCA TAC 952
 Tyr Arg Asp Ser Gln Asn Gly Lys Arg Asp Val Asn Pro Thr Ala Tyr
 160 165 170 175

TTC CAG CGA TAC GCT TTC AAC ACC AGT TTG ACT TTG AAC TAT GGA TTC 1000
 Phe Gln Arg Tyr Ala Phe Asn Thr Ser Leu Thr Leu Asn Tyr Gly Phe
 180 185 190

CGC ATC GAG GGC AAT GTG GAT GAT ACG CTG CTG CAT GAG ATT GTG GAT 1048
 Arg Ile Glu Gly Asn Val Asp Asp Thr Leu Leu His Glu Ile Val Asp
 195 200 205

GTG GAG CGT GGT GTG TCC AAC TTC CGC AGC ACT TCG AAC AAC TGG CAG 1096
 Val Glu Arg Gly Val Ser Asn Phe Arg Ser Thr Ser Asn Asn Trp Gln
 210 215 220

GAC TAC ATT CCC CTA TTG CGC ATT TTC CCC AAG ATG AAC AAT GAG GCC 1144
 Asp Tyr Ile Pro Leu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Met Asn Asn Glu Ala
 225 230 235

GCT GAC TTC CGG GGT CGC CGT GAT AAA TAT CTG ACC TAC TTG CTC GAT 1192
 Ala Asp Phe Arg Gly Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Thr Tyr Leu Leu Asp
 240 245 250 255

TAT TTG GAG GCC AGT GAG GGT GCA GGC ACT CCA CAC TAT GCA TAT GGA 1836
 Tyr Leu Glu Ala Ser Glu Gly Ala Gly Thr Pro His Tyr Ala Tyr Gly
 415 420 425 430
 GCG GGA TCA CGT ATG TGT GCA GGC TCA CAT CTC GCC AAT CGC GAG CTG 1884
 Ala Gly Ser Arg Met Cys Ala Gly Ser His Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 435 440 445
 TTC ACT GCT TTT ATC CGC CTC GTC ACT GCT TTC AAC ATG CAC ACG GCG 1932
 Phe Thr Ala Phe Ile Arg Leu Val Thr Ala Phe Asn Met His Thr Ala
 450 455 460
 AAG GAG ACG GCC GAC CGA CCG ATT CTG AAT GCA ATT GAG TGC AAT TTG 1980
 Lys Glu Thr Ala Asp Arg Pro Ile Leu Asn Ala Ile Glu Cys Asn Leu
 465 470 475
 ATT CCG ACA GCC TTG ACA ACC GAG CCG AAG CCA TTC AAG GTT GGC TTT 2028
 Ile Pro Thr Ala Leu Thr Thr Glu Pro Lys Pro Phe Lys Val Gly Phe
 480 485 490
 AGT GCA CGC GAC CCT AAG AAG CTT GAG CAG TGG ATT GCT GAG AGC GAT 2076
 Ser Ala Arg Asp Pro Lys Lys Leu Glu Gln Trp Ile Ala Glu Ser Asp
 495 500 505 510
 GAA CGG ACC AAA GAT CTA TAAGAGGAAG TTTTATCTGA TATGATTCCC TTTTTTTTTT
 Glu Arg Thr Lys Asp Leu
 515
 TCGGAGGCTA TTTATGTATC TACTTGAATA TATGTGAAAT AAAGGCAATG AAGTATAGAT 2194
 ATAGACCTGC CCAGGTGAGA CCTACATGTA TGTAATCGAC GTCTCCCGAGT ACCTATTTAG 2254
 GAACCGAATA GAAATTTGAG TGATGAAGGG TGAAGAATAA CCTCAGAGAA CATAGGTCTA 2314
 CTAAGATCTG CTAATTCTTA GACTCCTTTC CCTGAATTAT TGCCAATTTTC CCCAGTTGTC 2374
 TCTCTCCTCT ATGACTCCCG GCCTTGTCAC ACCGGCGGAA TCTCCCCGCA TTTTCCTCGA 2434
 CCTCACCTT TTCTTCCTCT TCACCCTCTC CCCATCCACT TGAAATGAAC CTCTGATCGC 2494
 AATCAATTGC ATCCCGAAGT CATTTTGGAT GATGAATAAT CCGCAGATGT ACCCTGTCTT 2554
 CGAG 2558

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 4

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 516 pares de bases

TIPO: aminoácidos

NÚMERO DE HEBRAS: 1
 CONFIGURACIÓN: lineal
 TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 CARACTERISTICA:
 OTRAS INFORMACIONES: secuencia de aminoácidos del
 enzima fenilacetato 2 hidroxilasa
 CARACTERISTICA:
 OTRAS INFORMACIONES: peso molecular 58112 Da.

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 4

Met Ala Ile Gln Thr Leu Ala Val Ala Val Ile Thr Val Val Tyr Phe
 1 5 10 15
 Val Ile Arg Tyr Phe Asn Arg Thr Asp Ile Pro Lys Ile Lys Gly Leu
 20 25 30
 Pro Glu Ile Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Asn Leu Leu Gln Leu Gly
 35 40 45
 Asp Gln His Ala Thr Val Thr Gly Lys Trp Ala Lys Lys Phe Gly Pro
 50 55 60
 Val Phe Gln Val Arg Met Gly Asn Lys Arg Ile Val Phe Ala Asn Gly
 65 70 75 80
 Phe Asp Ser Val Arg Gln Leu Trp Ile Lys Asp Ser Ser Ala Leu Ile
 85 90 95
 Ser Arg Pro Thr Phe His Thr Phe His Ser Val Val Ser Ser Ser Gln
 100 105 110
 Gly Phe Thr Ile Gly Thr Ser Pro Trp Asp Asp Ser Cys Lys Lys Arg
 115 120 125
 Arg Lys Ala Ala Ala Thr Ala Leu Asn Arg Pro Ala Val Gln Ser Tyr
 130 135 140
 Met Pro Ile Ile Asp Leu Glu Ser Asn Ser Ser Ile Lys Glu Leu Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asp Ser Gln Asn Gly Lys Arg Asp Val Asn Pro Thr Ala Tyr Phe
 165 170 175
 Gln Arg Tyr Ala Phe Asn Thr Ser Leu Thr Leu Asn Tyr Gly Phe Arg
 180 185 190

- 35 -

Ile Glu Gly Asn Val Asp Asp Thr Leu Leu His Glu Ile Val Asp Val
 195 200 205
 Glu Arg Gly Val Ser Asn Phe Arg Ser Thr Ser Asn Asn Trp Gln Asp
 210 215 220
 Tyr Ile Pro Leu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Met Asn Asn Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Asp Phe Arg Gly Arg Arg Asp Lys Tyr Leu Thr Tyr Leu Leu Asp Met
 245 250 255
 Leu Lys Asp Arg Ile Ala Lys Gly Thr Asp Lys Pro Cys Ile Thr Gly
 260 265 270
 Asn Ile Leu Lys Asp Pro Glu Ala Lys Leu Asn Asp Ala Glu Val Lys
 275 280 285
 Ser Ile Cys Leu Thr Met Val Ser Ala Gly Leu Asp Thr Val Pro Gly
 290 295 300
 Asn Leu Ile Met Gly Ile Ala Tyr Leu Ala Ser Glu Asp Gly Gln Arg
 305 310 315 320
 Ile Gln Lys Lys Ala Tyr Asp Ala Ile Met Glu Val Tyr Pro Asp Gly
 325 330 335
 Asp Ala Trp Glu Lys Cys Leu Val Glu Glu Lys Val Pro Tyr Val Thr
 340 345 350
 Ala Leu Val Lys Glu Val Leu Arg Phe Trp Thr Val Ile Pro Ile Cys
 355 360 365
 Leu Pro Arg Glu Ser Thr Lys Asp Ile Gln Trp Asn Gly Ala Thr Ile
 370 375 380
 Pro Ala Gly Thr Thr Phe Phe Met Asn Val Trp Ala Ala Asp Tyr Asp
 385 390 395 400
 Glu Asp His Phe Lys Asp Ala Asp Lys Phe Ile Pro Glu Arg Tyr Leu
 405 410 415
 Glu Ala Ser Glu Gly Ala Gly Thr Pro His Tyr Ala Tyr Gly Ala Gly
 420 425 430
 Ser Arg Met Cys Ala Gly Ser His Leu Ala Asn Arg Glu Leu Phe Thr
 435 440 445
 Ala Phe Ile Arg Leu Val Thr Ala Phe Asn Met His Thr Ala Lys Glu
 450 455 460
 Thr Ala Asp Arg Pro Ile Leu Asn Ala Ile Glu Cys Asn Leu Ile Pro
 465 470 475 480

- 36 -

Thr Ala Leu Thr Thr Glu Pro Lys Pro Phe Lys Val Gly Phe Ser Ala
485 490 495
Arg Asp Pro Lys Lys Leu Glu Gln Trp Ile Ala Glu Ser Asp Glu Arg
500 505 510
Thr Lys Asp Leu
515

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento de inactivación en microorganismos, de genes que codifican para enzimas del catabolismo del fenilacetato y que compiten por este compuesto con las enzimas biosintéticas de penicilina, que consiste en una transformaci3n integrativa por recombinaci3n hom3loga entre
10 al menos un compuesto de ADN ex3geno y al menos una parte de la secuencia del gen que se va a inactivar.

2. Un procedimiento seg3n la reivindicaci3n 1, en el que el compuesto de ADN transformante es una mol3cula circular que contiene al menos un fragmento expresable del gen que se va a inactivar.
15

3. Un procedimiento seg3n la reivindicaci3n 1, en el que el compuesto de ADN transformante es una mol3cula lineal que contiene al menos un fragmento de ADN no incluido
20 en la secuencia del gen a inactivar, pero que contiene al menos un marcador de transformaci3n que interrumpe la secuencia codificante del mismo.

4. Un procedimiento seg3n las reivindicaciones anteriores, en el que la mol3cula de ADN transformante contiene, total o parcialmente, una copia de la secuencia del gen que se va a inactivar con una mutaci3n, preferentemente, de cambio de marco de lectura, sin sentido o delecci3n, que tenga como resultado un fenotipo de p3rdida de funci3n de dicho gen.
25

5. Un procedimiento seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo objeto de transformaci3n en el que se inactiva el gen es capaz de producir penicilina G o V.
30

6. Un procedimiento seg3n la reivindicaci3n 5, en el que el microorganismo productor de penicilina G o V, es un hongo.
35

- 38 -

7. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el microorganismo transformado es *Aspergillus nidulans*.

5 8. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el microorganismo transformado es *Penicillium chrysogenum*.

9. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en que el compuesto de ADN transformante utilizado es incluible, total o parcialmente, en un vector, preferentemente en el plásmido pPhacA::argB.
10

10. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 y 8, en que el compuesto de ADN transformante utilizado es incluible, total o parcialmente, en un vector, preferentemente en el plásmido pALP696.

15 11. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7 y 9, en que el gen que se inactiva está representado por SEQ ID NO:1, sus secuencias génicas mutadas y/o genes homólogos.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en que el gen que se inactiva codifica para un polipéptido representado por SEQ ID NO:2, o secuencias similares que expresen actividad P450 fenilacetato 2-hidroxilasa.
20

13. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, 8 y 10, en que el gen que se inactiva está representado por SEQ ID NO:3, sus secuencias génicas mutadas y/o genes homólogos.
25

14. Un procedimiento según la reivindicación 13, en que el gen que se inactiva codifica para un polipéptido representado por SEQ ID NO:4, o secuencias similares que expresen actividad P450 fenilacetato 2-hidroxilasa.
30

15. Una cepa transformada de *Aspergillus nidulans* y mutantes derivados de la misma que incorpora al menos un compuesto de ADN exógeno que consiste en una secuencia truncada, incompleta o inactiva de al menos un gen que codifica para una enzima del catabolismo de fenilacetato y
35

- 39 -

que inactiva el gen endógeno tras su integración por recombinación homóloga.

16. Una cepa transformada de *A. nidulans* según la reivindicación 15, en la que el gen a inactivar codifica para una enzima que media la hidroxilación de fenilacetato.

17. Una cepa transformada de *A. nidulans* según las reivindicaciones 15 y 16, en la que el gen que se inactiva es *phacA*, cuya secuencia y regiones flanqueantes se describen en SEQ ID NO:1, sus secuencias génicas mutadas y genes homólogos.

18. Una cepa transformada de *A. nidulans* según la reivindicación 17, en la que el gen que se inactiva es homólogo a *phacA*, de procedencia distinta de *A. nidulans* y cuya homología con la secuencia de ADN del gen *phacA* de *A. nidulans* es suficiente para mediar recombinación homóloga con el locus endógeno de *A. nidulans*.

19. Una cepa transformada de *A. nidulans* según las reivindicaciones 15 a 18, en la que el gen que se inactiva codifica para un polipéptido representado por la secuencia proteica SEQ ID NO:2, o secuencias similares que expresen actividad P450 fenilacetato 2-hidroxilasa.

20. Una cepa transformada según las reivindicaciones 15 a 19, caracterizada por consistir en una cepa pura de *A. nidulans* CECT20195, sus mutantes y/o derivados transformados.

21. Un plásmido *pPhacA::argB* de inactivación del gen *phcA* de *A. nidulans* tal y como se muestra en el mapa de restricción de la Figura 6 y que consiste en el plásmido *pUC18* que contiene un inserto *EcoRI* de 6,8 kb el cual incluye el gen *phacA* de *A. nidulans* inactivado mediante la inserción de un fragmento de 3,2 kb que a su vez contiene el gen *argB* de *A. nidulans*.

22. Una cepa transformada de *Penicillium chrysogenum* y mutantes derivados de la misma que contiene un compuesto de

- 40 -

ADN que consiste en una secuencia truncada, incompleta o inactiva de un gen que codifica para una enzima del catabolismo de fenilacetato y que inactiva el gen endógeno tras su integración por recombinación homóloga.

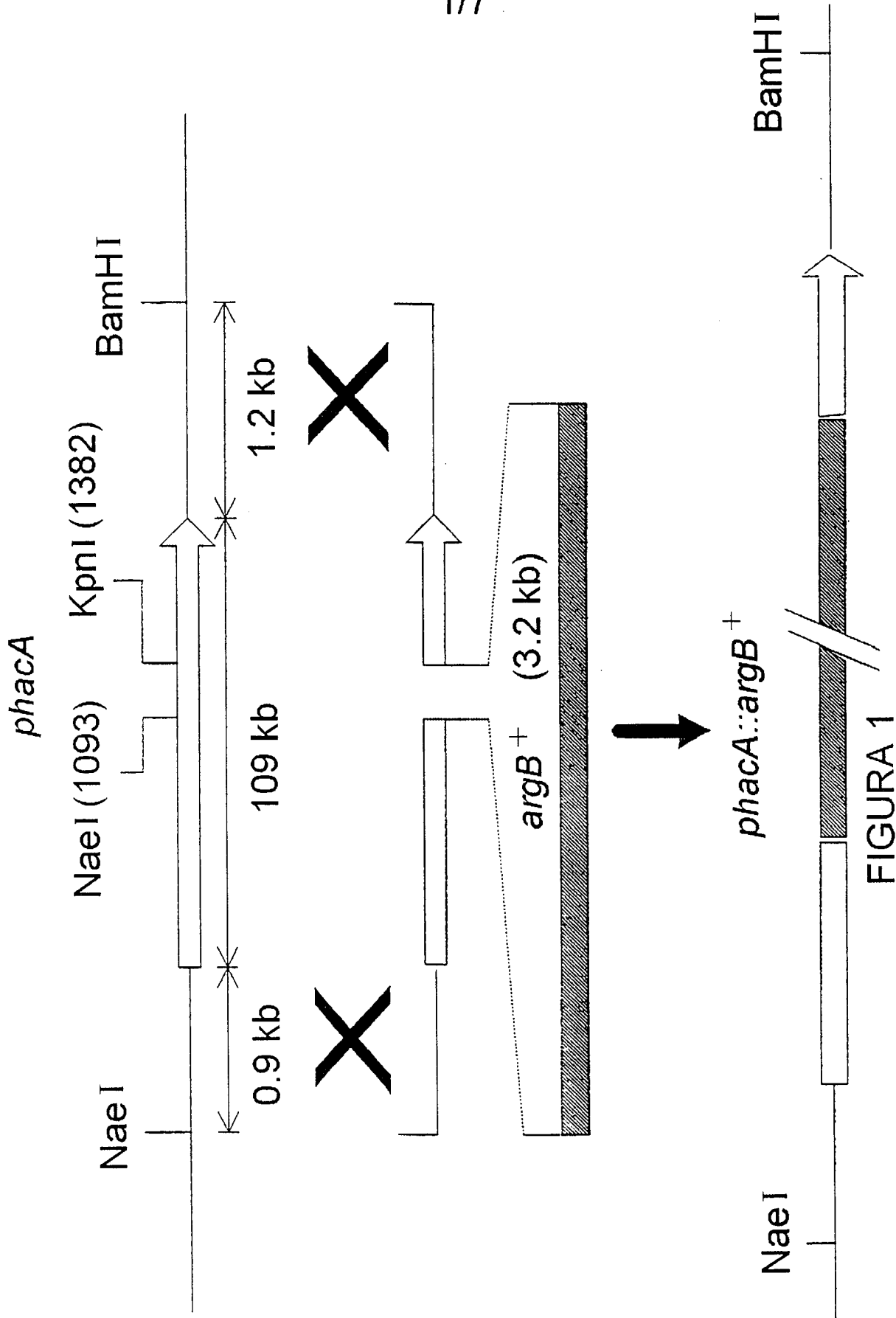
5 23. Una cepa transformada de *P. chrysogenum* según la reivindicación 22, en la que el gen a inactivar codifica para un enzima que media la hidroxilación de fenilacetato.

 24. Una cepa transformada de *P. chrysogenum* según las reivindicaciones 22 y 23, en la que el gen es *phcA*, cuya
10 secuencia y la de sus regiones flanqueantes se describen en SEQ ID NO:3, sus secuencias génicas mutadas y/o genes homólogos.

 25. Una cepa transformada de *P. chrysogenum* según las reivindicaciones 22 a 24, en la que el gen que se inactiva
15 codifica para un polipéptido representado por la secuencia proteica SEQ ID NO:4, o secuencias similares que expresen actividad P450 fenilacetato 2-hidroxilasa definida.

 26. Una cepa transformada de *P. chrysogenum* según la reivindicación 24, en la que el gen es *phacA* de *A. nidulans*
20 o cualquier otro compuesto de ADN homólogo aislado de una fuente distinta de *P. chrysogenum* y cuya homología con la secuencia del ADN de *pahA* de *P. chrysogenum* es suficiente para mediar recombinación homóloga con el locus endógeno de *P. chrysogenum*.

25 27. Un plásmido pALP696 de inactivación el gen *pahA* de *P. chrysogenum*, tal como se muestra en el mapa de restricción de la Figura 7 y que consiste en el plásmido pBC KS+ que contiene un inserto *SalI* de 7,9 kb el cual incluye el gen *pahA* de *P. chrysogenum* inactivado mediante la inserción
30 de un fragmento de 2,0 kb que a su vez contiene el gen *ble^R* de *S. hindustanus* expresado bajo el control del promotor *gdh* de *P. chrysogenum*.



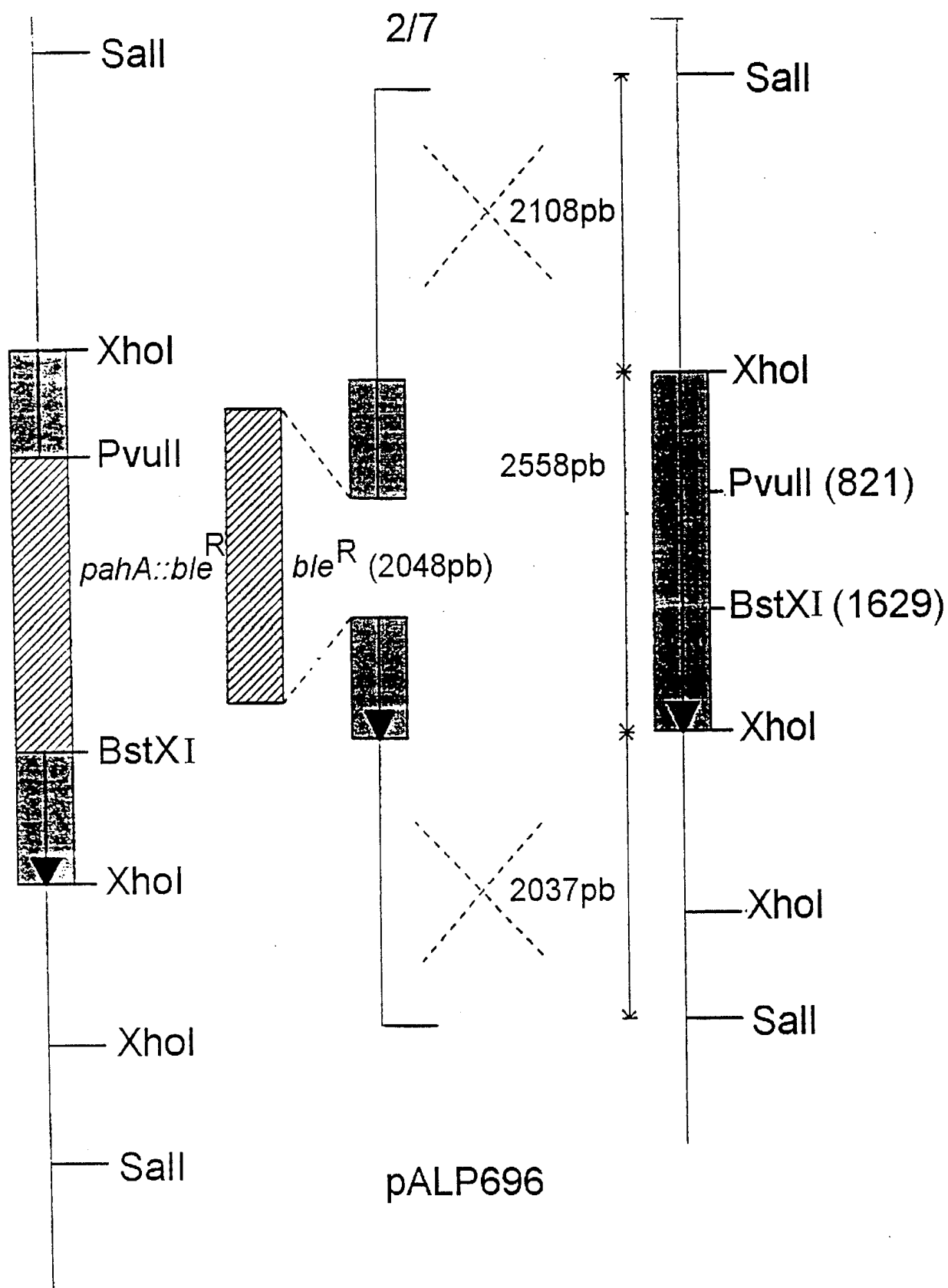


FIGURA 2

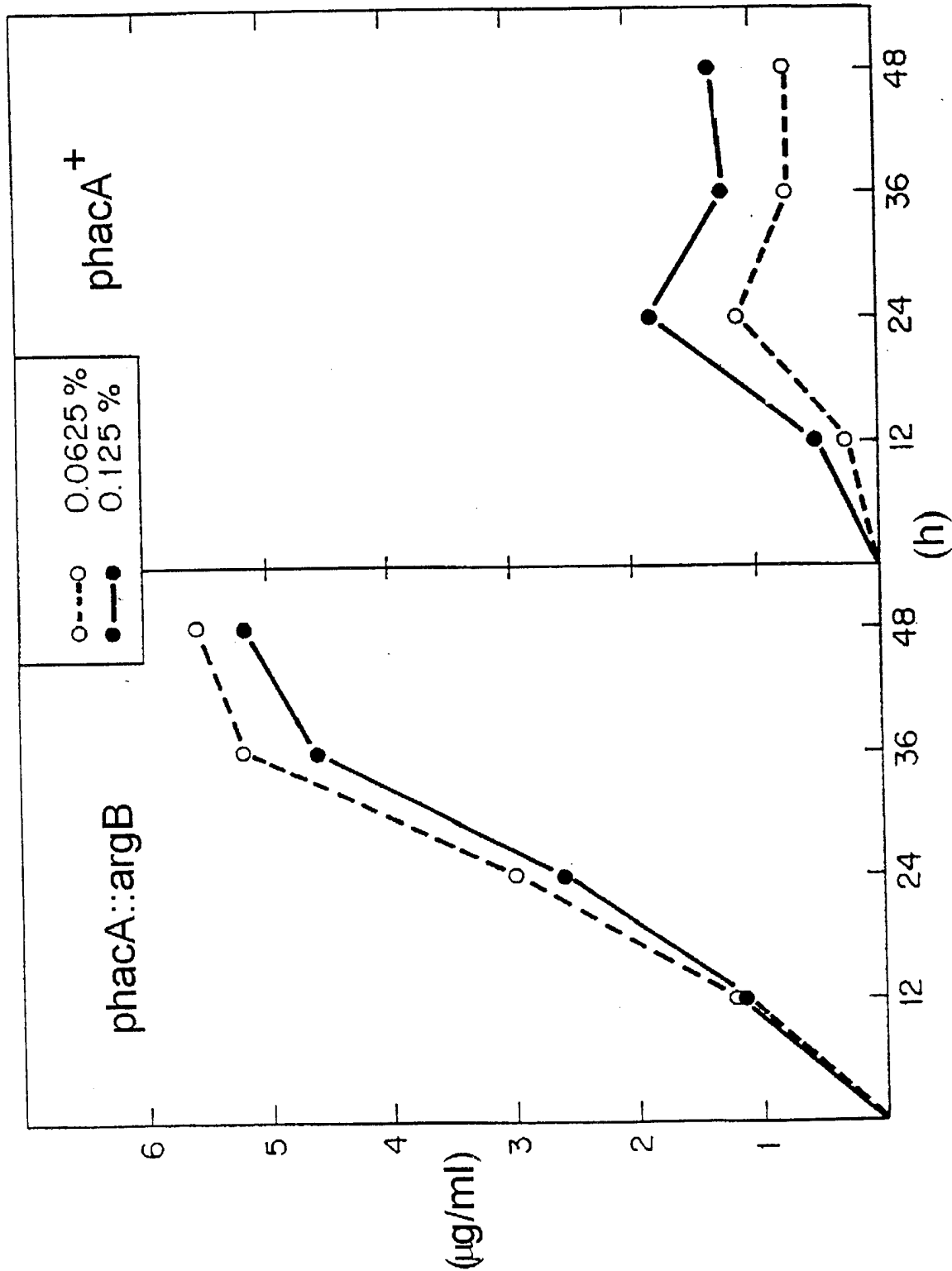


FIGURA 3

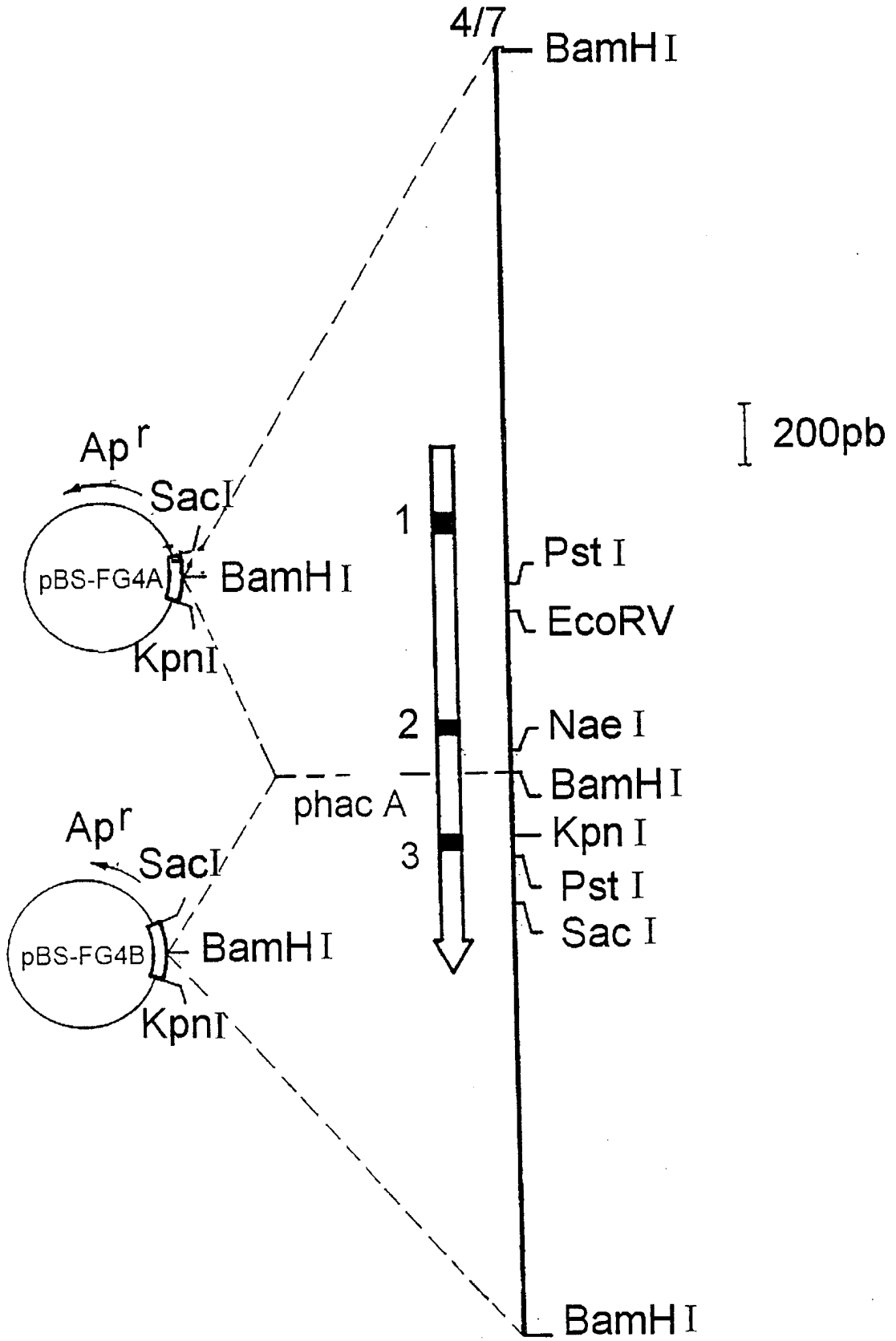


FIGURA 4

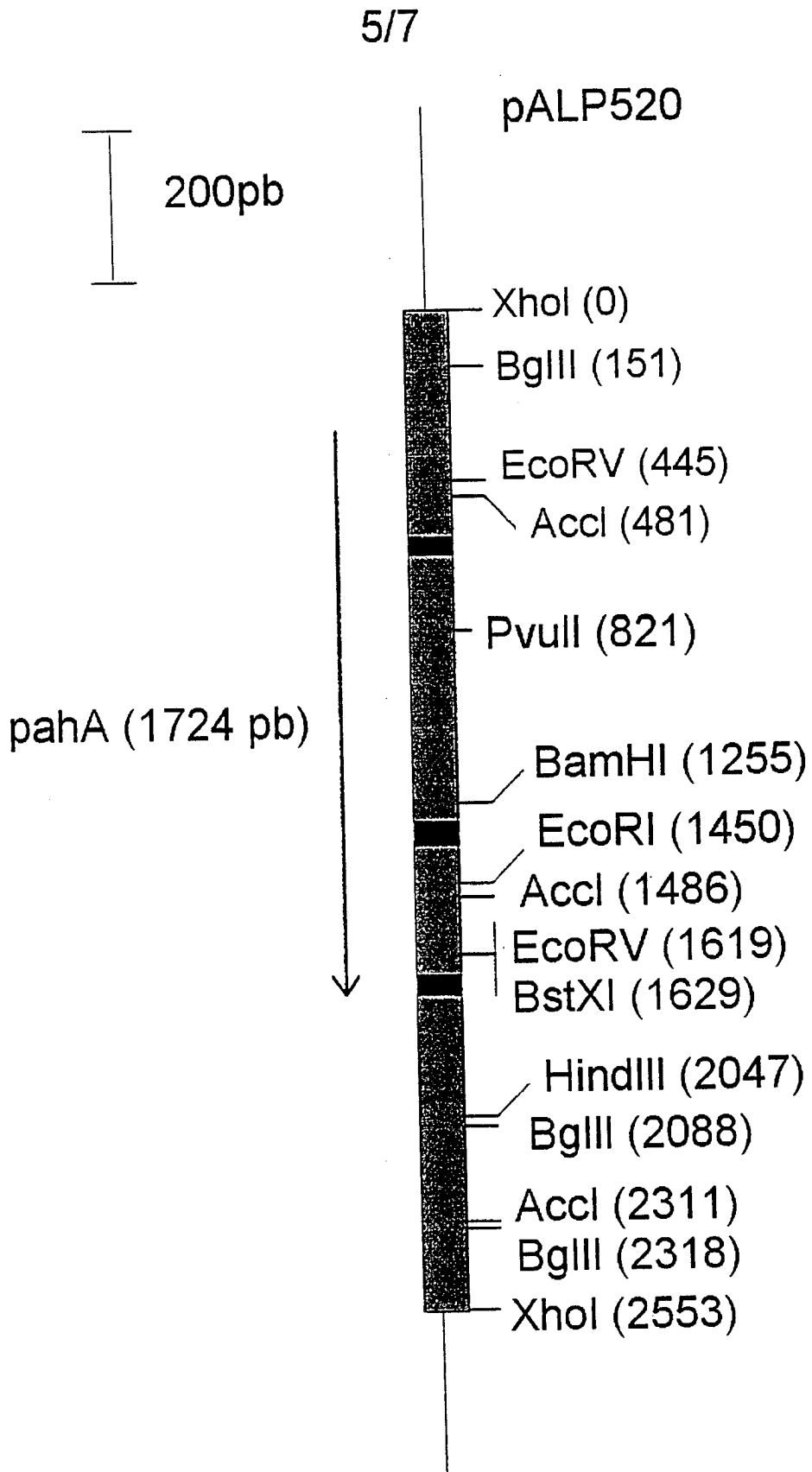


FIGURA 5

6/7

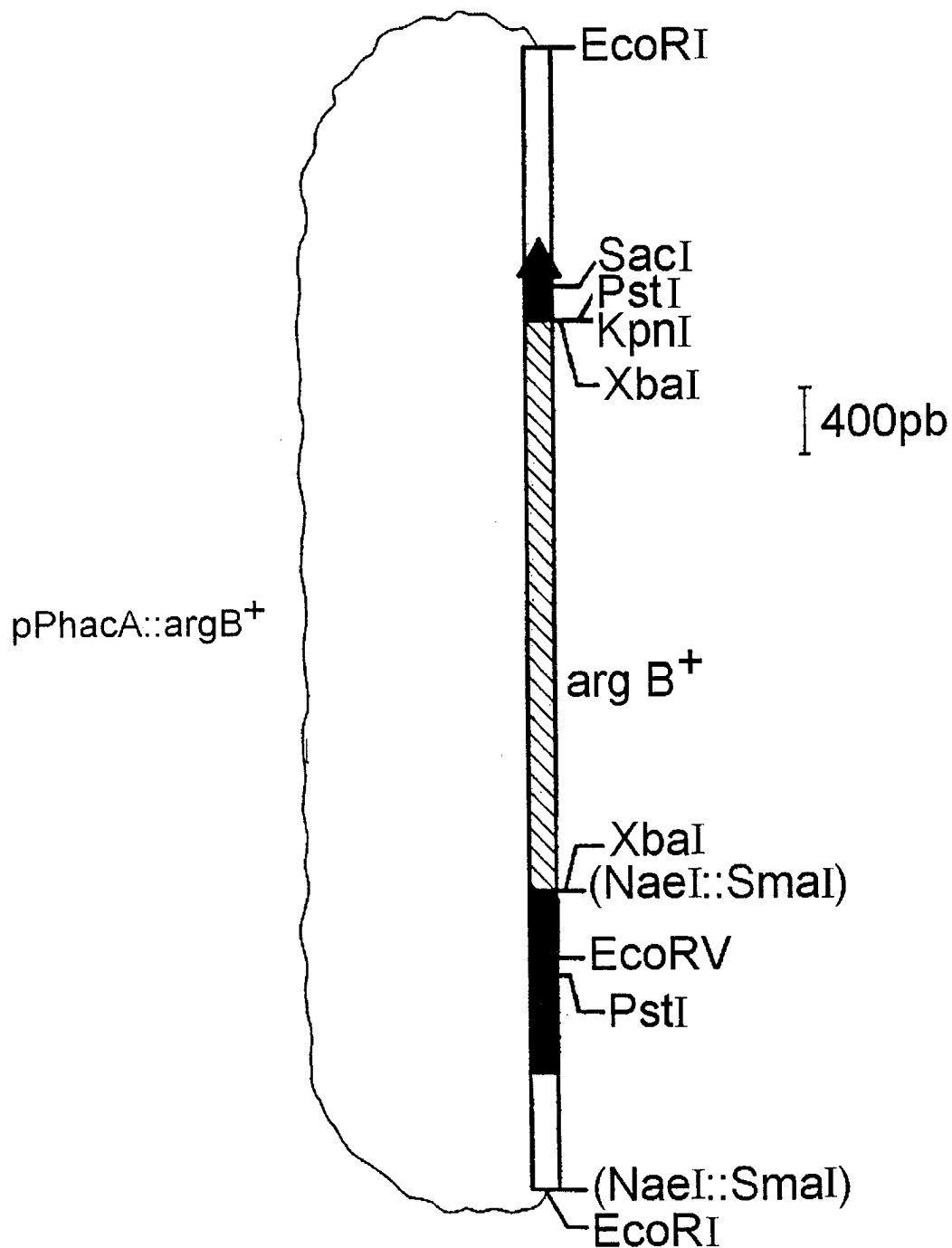


FIGURA 6

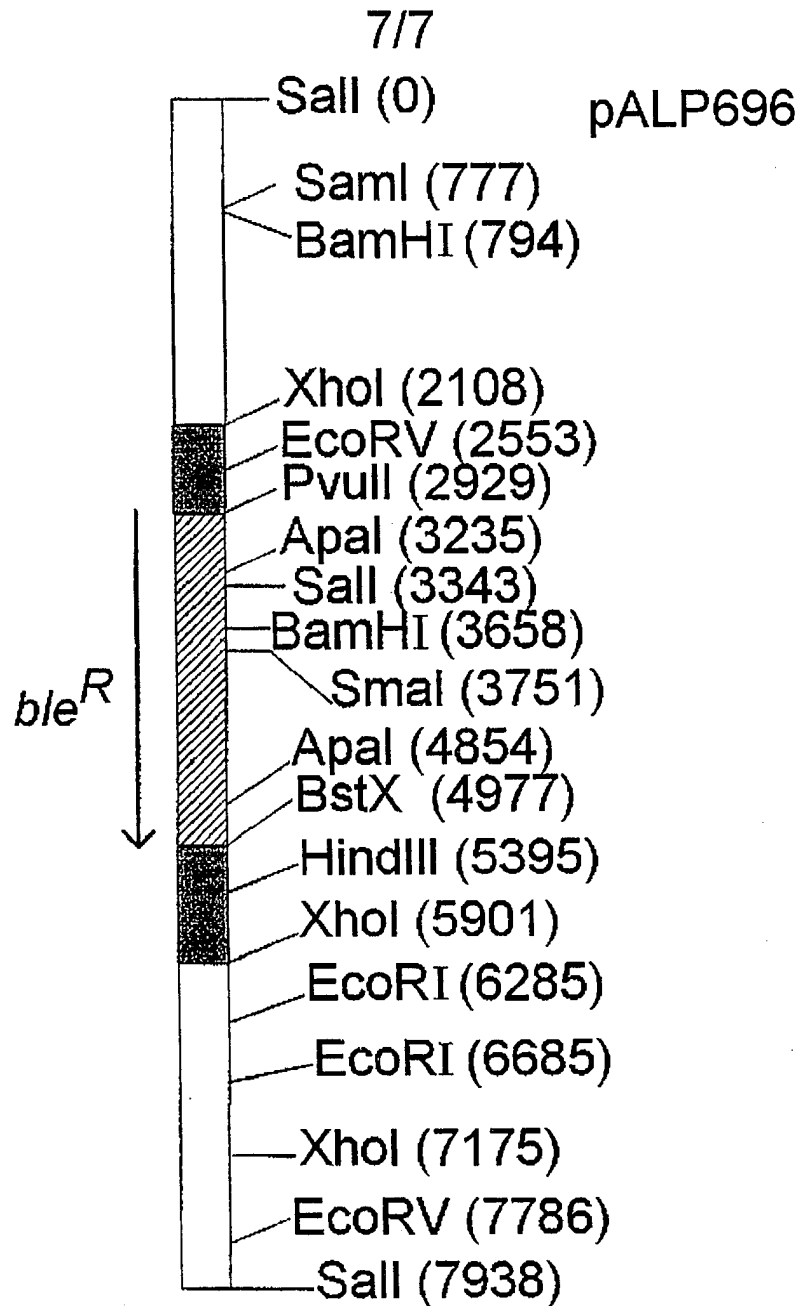


FIGURA 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 98/00101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: C12N 15/53, 9/06, 15/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CA, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUGUMARAN, M. et al., "Microsomal hydroxylation of phenylacetic acid by Aspergillus niger", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1979. Vol. 5, pages 427-430 See the whole document	1-14
A	WU, T-S, et al. " Recombinational inactivation of the gene encoding nitrate reductase in Aspergillus parasiticus". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1993 Vol. 59, number 9, pages 2998-3002 See the whole document	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 July 1998 (23.07.98)

Date of mailing of the international search report

31 July 1998 (31.07.98)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

S.P.T.O

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 98/00101

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SMITH, J. et al. "PCR-based gene disruption in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1995 Vol. 5, pages 270-277 See the whole document	1-14
A	PRIETO, M.A., et al. "Characterization of an <i>Escherichia coli</i> aromatic hydroxylase with a broad substrate range". JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1993 Vol. 175, number 7, pages 2162-2167 See the whole document	1-14
A	US 4963487 A (SCHIMMEL) 16.10.90 See the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 98/00101

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4963487 A	16.10..90	US 4774180 A US 4713337 A WO8705331 A EP 0257095 A JP 63502723 T	27.09.88 15.12.87 11.09.87 02.03.88 13.10.88

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 98/00101

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ C12N 15/53, 9/06, 15/90

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CA, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SUGUMARAN, M. et al., "Microsomal hydroxylation of phenylacetic acid by Aspergillus niger", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1979, Volumen 5, páginas 427-430 Ver el documento completo	1-14
A	WU, T-S, et al. " Recombinational inactivation of the gene encoding nitrate reductase in Aspergillus parasiticus", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1993 Volumen 59, número 9, páginas 2998-3002 Ver el documento completo	1-14

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" documentos anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 23 Julio 1998 (23.07.98)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

31 JUL 1998 (31.07.98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional (O.E.P.M.)

Funcionario autorizado
José L. Vizán

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
nº de fax +34 91 3495304

nº de teléfono + 34 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 98/00101

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SMITH, J. et al. "PCR-based gene disruption in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1995 Volumen 5, páginas 270-277 Ver el documento completo	1-14
A	PRIETO, M.A., et al. "Characterization of an <i>Escherichia coli</i> aromatic hydroxylase with a broad substrate range". JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1993 Volumen 175, número 7, páginas 2162-2167 Ver el documento completo	1-14
A	US 4963487 A (SCHIMMEL) 16.10.90 Ver el documento completo	1-14

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 98/00101

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 4963487 A	16.10..90	US 4774180 A US 4713337 A WO8705331 A EP 0257095 A JP 63502723 T	27.09.88 15.12.87 11.09.87 02.03.88 13.10.88
<hr/>			