



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 750**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/21** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02708684 .2**  
96 Fecha de presentación : **27.03.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1375664**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Método de secreción y de producción de proteínas.**

30 Prioridad: **30.03.2001 JP 2001-98808**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.04.2010**

73 Titular/es: **Ajinomoto Co., Inc.**  
**15-1 Kyobashi 1-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-0031, JP**

72 Inventor/es: **Kikuchi, Yoshimi;**  
**Date, Masayo;**  
**Umezawa, Yukiko;**  
**Yokoyama, Keiichi;**  
**Heima, Haruo y**  
**Matsui, Hiroshi**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 335 750 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).

## DESCRIPCIÓN

Método de secreción y de producción de proteínas.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un método para producir eficientemente una proteína heteróloga por producción secretora.

10 Previamente se ha informado sobre una cantidad de métodos para la producción secretora de proteínas heterólogas, tales como los descritos en la revisión sobre la producción secretora de una proteína heteróloga por parte de una bacteria perteneciente al género *Bacillus* [Microbial. Rev., 57, 109-137 (1993)], en la revisión sobre la producción secretora de una proteína heteróloga por parte de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* [Biotechnol., 11, 905-910 (1993)], y en el informe sobre la producción industrial de proteínas heterólogas por parte del moho perteneciente al género *Aspergillus* [Biotechnol., 6, 1419-1422 (1988); Biotechnol., 9, 976-981 (1991)].

15 La transglutaminasa producida por la producción secretora de acuerdo con una realización de la presente invención es una enzima que cataliza la reacción de transferencia de acilos de los grupos  $\gamma$ -carboxilamida de la cadena peptídica de la proteína. Cuando la enzima se hace reaccionar con una proteína, puede ocurrir la formación del enlace cruzado  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys y el reemplazo de Gln con Glu por desamidación. La transglutaminasa se ha utilizado para fabricar productos alimenticios gelificados tales como jaleas, yogur, queso o cosméticos gelificados y otros, y para mejorar la calidad de carnes y similares (Publicación japonesa de solicitud examinada Núm. 1-50382). Además, la transglutaminasa es una enzima que tiene una gran utilidad industrial dado que ha sido utilizada para fabricar materiales para microcápsulas termoestables, vehículos para enzimas inmovilizadas, etc.

20 Las transglutaminasas obtenidas a partir de animales y de microorganismos (transglutaminasa microbiana: denominada de aquí en más "MTG") se han conocido con anterioridad. La primera es una enzima dependiente del ion calcio que está distribuida en órganos de animales, piel, sangre, etc. Los ejemplos incluyen transglutaminasa hepática de cobayo (K. Ikura *et al.* Biochemistry 27, 2898 (1988)), transglutaminasa de queratinocitos epidérmicos humanos (M. A. Phillips *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9333 (1990)), factor XIII de coagulación sanguínea humano (A. Ichinose *et al.* Biochemistry 25, 6900 (1990)) y otros.

25 En cuanto a la segunda, se han descubierto transglutaminasas independientes del calcio de bacterias pertenecientes al género *Streptovorticillium*, que incluyen, por ejemplo, *Streptovorticillium griseocarneum* IFO 12776, *Streptovorticillium cinnamoneum* sub-especie *cinnamoneum* (de aquí en más puede abreviarse *S. cinnamoneum*) IFO 12852, *Streptovorticillium mobaraense* (de aquí en más puede abreviarse *S. mobaraense*) IFO 13819 y otras (Publicación de Solicitud de Patente japonesa no examinada (JP-Kokai Núm. 64-27471)). El mapeo peptídico y el análisis estructural de los genes reveló que la estructura principal de la transglutaminasa producida por estos microorganismos no compartió homología alguna con las transglutaminasas de origen animal (Publicación de Solicitud de Patente europea Núm. 0 481 504 A1).

30 Dado que las transglutaminasas obtenidas a partir de microorganismos (MTG) se producen a través de la purificación de los cultivos de microorganismos tales como los descritos con anterioridad, han existido problemas en términos de cantidad, eficiencia y similares. También se ha intentado la producción de transglutaminasa utilizando procedimientos de manipulación genética. Las proteínas transglutaminasas y sus genes han sido informados, por ejemplo, en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994), Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 88-92 (1994), Biochimie, 80, 313-319 (1998), Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998), WO 96/06931, WO 96/22366, etc., que reportan la expresión y producción de transglutaminasa en sistemas de hospedante-vector tales como *Streptomyces lividans*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*. Además de esta información, se ha informado un método en el que se produce una transglutaminasa por producción secretora en microorganismos tales como *E. coli* y levadura (JP-Kokai Núm. 5-199.883) y se ha informado un método en el que se produce MGT activa expresando MTG como una proteína fusionada inactiva en un cuerpo de inclusión dentro de *E. coli* y solubilizando posteriormente el cuerpo de inclusión empleando agentes desnaturizantes de proteínas y reconstituyéndolo después por eliminación de los agentes desnaturizantes (JP-Kokai No. 6-30771). Sin embargo, se ha evidenciado el problema de que el nivel de expresión es significativamente bajo en la producción secretora de microorganismos tales como *E. coli* o levaduras.

35 Por otra parte, existen ejemplos de estudios previos para la producción secretora eficiente de proteínas heterólogas utilizando una bacteria corineforme, que incluyen la secreción de nucleasas y lipasas [US4965197, J. Bacteriol., 174, 1854-1861 (1992)] y la secreción de proteasas tales como subtilisina [Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995)] por parte de *Corynebacterium glutamicum* (de aquí en más puede abreviarse *C. glutamicum*), un estudio sobre la secreción de proteínas de superficie celular de una bacteria corineforme [Solicitud de Patente Internacional publicada en Japón No. 6-502.548], la secreción de una proteína de unión a fibronectina que utiliza este estudio [Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400 (1997)], un informe en el que se aumentó la secreción de proteínas utilizando una maquinaria secretora mutada [JP-Kokai Núm. 11-169182], etc., pero ha habido una cantidad limitada de informes sobre proteínas limitadas. A la luz de la cantidad acumulada de proteínas, se describe en Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995) que se acumularon aproximadamente 2,5 mg/ml de proteína por expresión del gen de la proteasa alcalina de *Dichelobacter nodosus* en *C. glutamicum* utilizando un promotor del gen (*aprE*) de subtilisina de *Bacillus subtilis*, un sitio de unión al ribosoma y la secuencia de un péptido señal, pero en US4965197, JP-Kokai No. 6-

502548 y JP-Kokai No. 11-169182 no se describen específicamente los valores de la cantidad de proteínas secretadas y acumuladas. Además, en el caso de la proteína de unión a fibronectina [Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400 (1997)], sólo se confirma la acumulación secretora de la proteína de aproximadamente 2,5  $\mu\text{g/l}$ . Por lo tanto, no ha habido informes de que pudieran acumularse eficientemente proteínas heterólogas en el medio a un nivel práctico.

Además, se ha desarrollado una tecnología de ingeniería genética para una bacteria corineforme en el sistema que utiliza plásmido y fago, tal como el establecimiento de la transformación por protoplasto [J. Bacteriol., 159, 306-311 (1984); J. Bacteriol., 161, 463-467 (1985)], el desarrollo de un tipo diferente de vectores [Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984); J. Bacteriol., 159, 306-311 (1984); J. Gen. Microbiol., 130, 2237-2246 (1984); Gene, 47, 301-306 (1986); Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 65-69 (1989)], el desarrollo del método de regulación de la expresión genética [Bio/Technology, 6, 428-430 (1988)] y el desarrollo de un cósmido [Gene, 39, 281-286 (1985)]. Además, existen informes sobre la clonación de genes de una bacteria corineforme [Nucleic Acids Res., 14, 10113-1011 (1986); J. Bacteriol., 167, 695-702 (1986); Nucleic Acids Res., 15, 10598 (1987); Nucleic Acids Res., 15, 3922 (1987); Nucleic Acids Res., 16, 9859 (1988); Agric. Biol. Chem., 52, 525-531 (1988); Mol. Microbiol., 2, 63-72 (1988); Mol. Gen. Genet., 218, 330-339 (1989); Gene, 77, 237-251 (1989)].

Además, se ha informado un elemento transposable obtenido a partir de una bacteria corineforme [WO 93/18.151; Ep 0.445.385; JP-Kokai No. 6-46.867; Mol. Microbiol., 11, 739-746 (1994); Mol. Microbiol., 14, 571-581 (1994); Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994); FEMS Microbiol. Lett., 126, 1-6 (1995); JP-Kokai No. 7-107976].

El elemento transposable es un fragmento de ADN que puede transposarse sobre el cromosoma y que es conocido por estar presente en una amplia variedad de organismos que oscilan de procariotas a eucariotas. Se han desarrollado transposones que utilizan elementos transposables [WO 93/18.151; JP-Kokai No. 7-107.976; Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994); JP-Kokai No. 9-70.291] y un gen heterólogo se ha vuelto capaz de ser expresado utilizando un transosón.

### Compendio de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la producción de una proteína heteróloga, haciendo que una bacteria corineforme produzca una proteína heteróloga industrialmente útil, por ejemplo transglutaminasa, y segregue en forma eficiente el producto extracelularmente (es decir, producción secretora).

Los inventores de las presentes invenciones hallaron un mutante que tenía una capacidad de producción extraordinariamente superior en cuanto a la producción de proteínas heterólogas empleando bacterias corineformes, en comparación con la *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 de tipo salvaje, lo que derivó en las presentes invenciones.

Por consiguiente, la presente invención es un método para producir proteínas heterólogas caracterizado porque una proteína de fusión es producida y secretada (producida por secreción) por una bacteria corineforme mutante que tiene la capacidad de secretar la proteína heteróloga, que está conectada al lado 3' del péptido señal de una bacteria corineforme, al menos en una cantidad de dos veces la obtenida con *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 de tipo salvaje.

Más específicamente, la invención es un método para obtener una gran cantidad de una proteína heteróloga buscada, por ejemplo transglutaminasa, por introducción de una construcción de expresión genética en una bacteria corineforme, el cultivo de la bacteria corineforme así transformada, la secreción eficiente de la proteína resultante extracelularmente y la recuperación de la proteína liberada, en el que la construcción de expresión genética contiene una secuencia genética que codifica una proteína buscada que está ligada al lado 3' de una secuencia que codifica el péptido señal obtenido a partir de una bacteria corineforme, especialmente el péptido señal de una proteína de superficie celular.

Más específicamente, la presente invención es un método para producir una proteína heteróloga que comprende cultivar una bacteria corineforme que tiene una construcción de expresión genética en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de péptido señal, que funciona en una bacteria corineforme y que puede obtenerse a partir de una bacteria corineforme, está conectada al lado 3' de una secuencia promotora que funciona en una bacteria corineforme y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga está conectada al lado 3' de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicha región de péptido señal, siendo dicha bacteria corineforme *Corynebacterium glutamicum* AJ12036 (FERM BP-734) o una mutante que se puede obtener a partir de AJ12036 (FERM BP-734) que tiene la capacidad de secretar la proteína heteróloga en al menos el doble de la cantidad secretada por la *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 de tipo salvaje, permitiendo que dicha bacteria corineforme produzca dicha proteína heteróloga, y recuperar dicha proteína heteróloga producida.

Como se utiliza en la presente memoria, "la secreción" de una proteína o péptido se refiere al transporte de la proteína o molécula peptídica fuera de la célula bacteriana (transporte extracelular), que incluye el caso en el que la proteína o molécula peptídica finalmente existe en forma completamente libre en el medio así como el caso en el que sólo parte de la proteína o molécula peptídica está presente fuera de la célula y el caso en el que están localizadas sobre la superficie de la célula.

### Descripción de las realizaciones preferidas

De acuerdo con el método de la invención, se utiliza una bacteria corineforme como sistema hospedante-vector, y puede obtenerse una gran cantidad de una proteína de interés secretada extracelularmente generando una construc-

## ES 2 335 750 T3

ción de expresión en la que el gen que codifica la proteína de interés está ligado al lado 3' del péptido señal de la proteína de superficie celular de la bacteria corineforme, introduciendo la construcción en una bacteria corineforme y expresándola.

5 Las proteínas que pueden producirse por secreción por el método de la presente invención incluyen enzimas, proteínas fisiológicamente activas y péptidos que son industrialmente útiles. La transglutaminasa, que es producida por secreción en una realización de la presente invención, es ampliamente utilizada en el procesamiento de alimentos, la fabricación de productos farmacéuticos y similares.

10 Se sabe en general que una proteína secretora es traducida como un pre-péptido o pre-propéptido y, de ahí en adelante, se transforma en una proteína madura. Es decir que, en general, se sabe que es traducida como un pre-péptido o pre-propéptido, después el péptido señal ("una pre-parte") se escinde, convirtiéndose así en un péptido o propéptido maduro por escisión posterior de la pro-parte con una proteasa. Como se utiliza en la presente memoria, "una secuencia señal" se refiere a la secuencia que está localizada en el extremo N-terminal de un precursor de una  
15 proteína secretora y que no está presente en una proteína madura natural, y un "péptido señal" se refiere al péptido que se escinde de tal precursor de proteína. En general, una secuencia señal es escindida, acoplado la secreción extracelular, por una proteasa (denominada en general señal-peptidasa). Aunque un péptido señal tal comparte ciertas características comunes en la secuencia entre especies, un péptido señal que tiene función secretora en una especie no tiene necesariamente la misma función secretora en otra especie.

20 Como se utiliza en la presente memoria, una proteína que contiene tanto un péptido señal como una pro-parte, o sea un producto traduccional primario, puede denominarse "pre-proteína", y una proteína que no contiene un péptido señal pero que contiene una pro-parte, puede denominarse "pro-proteína". Una pro-parte de una pro-proteína puede denominarse "una parte de una pro-estructura" o "una pro-estructura". "Una parte de una pro-estructura/pro-estructura"  
25 de una proteína puede utilizarse en la presente indistintamente con "una pro-parte" de una proteína. El péptido señal en una pre-proteína o pre-proteína puede obtenerse a partir de la proteína diferente o puede ser un péptido señal natural en la proteína buscada y, preferiblemente, proviene de una proteína secretora del hospedante a utilizar. Alternativamente, puede modificarse para que tenga el codón óptimo, dependiendo del uso de codones del huésped a utilizar.

30 Además, el péptido señal que puede utilizarse para el propósito de la invención puede contener una parte de la secuencia de aminoácidos N-terminal de una proteína madura natural a partir de la que se obtiene el péptido señal. Una pre-proteína puede especialmente denominarse "pre-proteína fusionada heterológamente" cuando el péptido señal proviene de la proteína diferente. Por ejemplo, cuando una proteína es transglutaminasa, se denominan  
35 "preprotransglutaminasa", "protransglutaminasa" y "preprotransglutaminasa fusionada heterológamente", respectivamente. Una proteína en la que "la pro-parte es escindida" se refiere a una proteína en la que al menos uno o más aminoácidos que constituyen su pro-parte son eliminados por ruptura del enlace peptídico, que incluye una proteína que tiene el aminoácido N-terminal idéntico a la proteína natural y también incluye una proteína que tiene uno o más aminoácidos extra en el extremo N-terminal provenientes de la pro-parte en comparación con la proteína natural, y una  
40 proteína que tiene una secuencia de aminoácidos más corta que la de una proteína madura natural, con la condición de que la proteína tenga la actividad de la proteína buscada.

Como se describe en los "Antecedentes de la Invención", se ha presentado una cantidad limitada de informes en los que se ha logrado la producción secretora extracelular de una proteína heteróloga usando una bacteria corineforme y el método de producción secretora no ha sido técnicamente establecido. Tampoco se ha informado de una bacteria corineforme que secrete extracelularmente por sí misma una proteína tal como una proteasa. Los ejemplos conocidos son la ADNasa endógena [US4.965197] y el hecho de que la proteína de superficie celular utilizada en la presente invención caiga de la superficie celular para ser hallada fuera de la célula [JP-Kokai No. 6-502548]. Sin embargo,  
45 tampoco se ha informado sobre ningún péptido señal involucrado en la secreción de una proteína de una bacteria corineforme, excepto por las proteínas de superficie celular. A la fecha, las únicas proteínas de superficie celular conocidas son los Genes para PS1 y PS2, las proteínas de superficie celular de *Corynebacterium glutamicum* [JP-Kokai No. 6-502548], y el gen para SIpA, la proteína de superficie celular de *Corynebacterium ammoniagenes* (que de aquí en más puede abreviarse como *C. ammoniagenes*) [JP-Kokai No. 10-108675]. Entre estas proteínas, PS1 y SIpA comparten cierta homología (aproximadamente 30%), pero casi no se ha halló homología entre otras y, además,  
50 no se halló homología entre los dominios de la secuencia señal. Como ejemplos de secuencias señales, se muestran las secuencias señales de PS1 y PS2 de *Corynebacterium glutamicum* en SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 2, y se muestra la secuencia señal de SIpA de *Corynebacterium ammoniagenes* en SEQ ID No: 3.

Por lo tanto, los inventores clonaron el gen de la proteína PS2 de *C. glutamicum* (antes, *Brevibacterium lactofermentum*), cepa ATCC13869, y determinaron la secuencia. Se descubrió que no había diferencias en el dominio de la secuencia señal respecto de la secuencia conocida de *C. glutamicum*, pero que había dos aminoácidos diferentes en la secuencia hasta el residuo de aminoácido treinta y ocho N-terminal de la proteína de superficie celular madura (Asn en lugar del residuo Thr en la posición 40 y Glu en lugar del residuo Gly en la posición 55 en la secuencia de aminoácidos, como se muestra en SEQ ID No: 5). La secuencia nucleotídica que codifica sesenta y ocho residuos que comprenden treinta residuos de aminoácidos del péptido señal y treinta y ocho residuos de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína de superficie celular madura y su región de corriente arriba 5' que contiene la región promotora, se muestra  
65 en SEQ ID No: 4 y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID No: 5.

## ES 2 335 750 T3

Después, los inventores examinaron la secreción de una proteína heteróloga utilizando la región que contiene la región promotora o la región del péptido señal de la proteína de superficie celular para determinar si puede lograrse la producción secretora extracelular de una gran cantidad de la proteína heteróloga en una bacteria corineforme.

5 Dado que un gen de transglutaminasa de un actinomiceto tiene un alto contenido de GC y que el gen de una bacteria corineforme tiene un contenido de GC similar al del gen de actinomicetos, y que también tienen un uso de codones estrechamente similar, existe la ventaja de que puede utilizarse directamente el gen de actinomicetos. Por lo tanto, los inventores investigaron si un gen de transglutaminasa puede utilizarse directamente o no, y descubrieron que el péptido señal de transglutaminasa de actinomicetos no funcionó con éxito en una bacteria corineforme. Sin embargo, 10 se revela que el gen de transglutaminasa que codifica la proteína madura que contiene la parte de pro-estructura de actinomicetos fusionada con el péptido señal de la proteína de superficie celular de una bacteria corineforme funcionó en forma efectiva sin modificación alguna y que se secretó eficientemente fuera de la célula como proproteína que contiene la parte de pro-estructura. Cuando se utilizó el gen para transglutaminasa con la parte de pro-estructura que además comprende treinta residuos de aminoácidos de la proteína de superficie celular y treinta y ocho residuos del 15 dominio N-terminal de la proteína de superficie celular madura, es decir, el gen para transglutaminasa fusionado con el dominio N-terminal de la proteína de superficie celular madura, se observó un aumento adicional de la eficiencia de la secreción extracelular de transglutaminasa.

Como se utiliza en la presente memoria, una bacteria corineforme es un bacilo Gram positivo aeróbico, que incluye 20 bacterias que fueron previamente clasificadas como *Brevibacterium* pero que actualmente se unificaron como *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)), que incluye *Brevibacterium* que está estrechamente relacionada con *Corynebacterium*. El uso de *Corynebacterium* es ventajoso dado que secreta intrínsecamente muchas menos proteínas fuera de la célula en comparación con los mohos, levaduras o bacterias pertenecientes a *Bacillus* que han sido anteriormente reconocidas como apropiadas para llevar a cabo la secreción de una proteína heteróloga, que permite que el 25 proceso de purificación del producto sea fácil y más breve cuando se realiza la producción secretora de una proteína heteróloga, y dado que es excelente en términos de costo de medio, del procedimiento de cultivo y del rendimiento, ya que crece adecuadamente en un medio de cultivo simple tal como los compuestos por amoníaco, sales inorgánicas y similares.

30 Los ejemplos de *Corynebacterium* que pueden utilizarse como bacteria hospedante en la presente invención son las mutantes que tienen la capacidad de secretar una proteína heteróloga en al menos el doble de la cantidad secretada por la *Corynebacterium glutamicum* de tipo salvaje. Estas mutantes pueden obtenerse a partir de cepas de tipo salvaje que incluyen *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066, *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13869, *Brevibacterium roseum* ATCC13825, *Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC14067, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium lilium* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC15990, *Brevibacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium ammoniagenes*) ATCC6871 o a partir de sus mutantes. Las mutantes de la presente invención incluyen cepas mutantes defectuosas en su capacidad para producir glutamato, cepas mutantes para la 35 producción de aminoácidos tales como lisina y similares, y cepas mutantes para producir otras sustancias tales como ácidos nucleicos, por ejemplo inosina. Las mutantes de la presente invención pueden obtenerse seleccionando las cepas que tengan capacidad aumentada de producción secretora de proteínas después de ser irradiadas con rayos UV o tratando las bacterias con un mutágeno químico tal como N-metil-N'-nitrosoguanidina.

En particular, *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) AJ12036 (FERM BP-734) (Originalmente depositada el 26 de marzo de 1984) (Actualmente, Agencia Administrativa Independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) tiene una capacidad de producción secretora de proteínas heterólogas de al menos el doble a triple de la cantidad secretada por la cepa progenitora (cepa de tipo salvaje) en condiciones de cultivo óptimas, medida como 45 cantidad de acumulación, que puede deberse a la mutación en genes funcionales responsables de la secreción de proteínas. Así, esta cepa es adecuada como hospedante. Además, es particularmente preferible utilizar una cepa que se obtenga a partir de una mutante tal y que se modifique de tal manera que no produzca proteínas de superficie celular, dado que la purificación de proteínas heterólogas secretadas se tornaría más fácil. Tales modificaciones pueden realizarse introduciendo una mutación en las regiones que codifican las proteínas de superficie celular, o sus regiones de control de la expresión existentes en el genoma, por mutagénesis o utilizando técnicas de recombinación 55 genética.

En general, la construcción genética que puede utilizarse en la presente invención incluye un promotor, una secuencia que codifica un péptido señal apropiado y una fracción de ácido nucleico que codifica una proteína buscada, y una secuencia regulatoria (un operador o terminador) necesaria para expresar el gen para la proteína buscada en una bacteria corineforme, en una posición apropiada para que puedan funcionar. La proteína buscada puede tener una parte de pro-estructura en el extremo N-terminal. Los vectores que pueden utilizarse para esta construcción no están particularmente limitados e incluyen cualquier vector que pueda funcionar en una bacteria corineforme, y pueden ser aquellos que se multiplican en forma autónoma tales como los plásmidos o vectores que están integrados en el cromosoma de la bacteria. Se prefieren particularmente los plásmidos que se obtienen a partir de bacterias corineformes. 65 Estos incluyen, por ejemplo, pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)), pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)), y plásmidos obtenidos por modificación de los mencionados que poseen genes resistentes a fármacos.

## ES 2 335 750 T3

También pueden utilizarse transposones artificiales y similares. Cuando se utiliza un transposón, el gen buscado se introduce en el cromosoma a través de recombinación homóloga o por su propia capacidad de transposición.

Los promotores que pueden utilizarse en la invención no están particularmente limitados. En general, puede utilizarse cualquier promotor que pueda funcionar en la célula de una bacteria corineforme. También puede ser un promotor obtenido a partir de una especie diferente, por ejemplo un promotor obtenido a partir de *E. coli*, tal como un promotor tac, etc. Entre estos promotores, es más preferible un promotor potente, que incluye un promotor tac, etc.

Los ejemplos de promotores obtenidos a partir de una bacteria corineforme incluyen promotores de los genes de las proteínas PS1, PS2 y SIpA de superficie celular, promotores de los genes de sistemas biosintéticos de diferentes aminoácidos, por ejemplo el gen de la glutamato deshidrogenasa en el sistema biosintético del ácido glutámico, el gen de la glutamina sintetasa en el sistema sintético de glutamina, el gen de la aspartoquinasa en el sistema biosintético de lisina, el gen de la homoserina deshidrogenasa en el sistema biosintético de treonina, el gen de la acetohidroxilato sintasa en el sistema biosintético de isoleucina y valina, el gen de la 2-isopropilmalato sintasa, el gen de la fosforribosil-ATP pirofosforilasa en la síntesis biosintética de histidina, el gen de la ácido desoxiarabinohepturónico fosfato (DAHP) sintasa en el sistema biosintético de aminoácidos aromáticos tales como triptofano, tirosina y fenilalanina, etc., el gen de la fosforribosil pirofosfato (PRPP) amidotransferasa, el gen de la inosinato deshidrogenasa y el gen de la guanilato sintasa en el sistema biosintético de los ácidos nucleicos, tales como inosinato y guanilato.

El péptido señal que se utiliza en la presente invención es el péptido señal de una proteína secretora del hospedante, la bacteria Corineforme y, preferiblemente, es el péptido señal de una proteína de superficie celular de una bacteria Corineforme. Las proteínas de superficie celular incluyen PS1 y PS2 obtenidas a partir de *C. glutamicum* (JP-Kokai No. 6-502548) y SIpA obtenida a partir de *C. Ammoniagenes* (JP-Kokai No. 10-108675). La secuencia de aminoácidos de PS1 se muestra en SEQ ID No: 2, la secuencia de aminoácidos de PS2 en SEQ ID No: 1 y la secuencia de aminoácidos de SIpA se muestra en SEQ ID No: 3. Además, se informa que la ADNasa de una bacteria corineforme también tenía un péptido señal, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4.965.197, que también puede utilizarse en la presente invención.

Puede conectarse al péptido señal una porción de la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína secretora a partir de la que se obtiene el péptido señal. La secuencia señal es escindida por una señal-peptidasa mientras el producto traducido es secretado extracelularmente. Además, el gen que codifica el péptido señal puede utilizarse ya sea en forma nativa o en una forma modificada que contiene los codones óptimos, dependiendo del uso de codones en el hospedante a utilizar.

Cuando se utilizan estos péptidos señal, los genes que codifican proteínas buscadas se conectan al extremo 3'-terminal de los genes que codifican los péptidos señal y se ubican de modo tal que son sometidos a regulación de expresiones por los promotores descritos con anterioridad.

Esencialmente, las proteínas útiles que pueden producirse por secreción de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, todas las proteínas secretoras obtenidas a partir de animales, plantas y microorganismos. Por ejemplo, proteínas tales como una proteasa, una exopeptidasa, una aminopeptidasa, una carboxipeptidasa, una colagenasa y una quitinasa, pueden producirse por secreción de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, las proteínas que se preparan por producción secretora de acuerdo con la presente invención son proteínas secretoras naturales, más preferiblemente proteínas que tienen partes de pro-estructura adicionales. Se prefiere particularmente la transglutaminasa como proteína útil preparada por producción secretora de acuerdo con la presente invención. Como genes de transglutaminasa, pueden utilizarse, por ejemplo, genes para una transglutaminasa de tipo de secreción obtenidos a partir de actinomicetos, por ejemplo *S. mobaraense* IFO 13819, *S. cinnamoneum* IFO 12852, *Streptovercillium griseocarneum* IFO 12776, *Streptomyces lydicus* [WO9606931], etc., y mohos tales como Oomycetes [WO9622366], a los fines de la presente invención. Los genes que codifican estas proteínas pueden modificarse dependiendo del tipo de hospedante a utilizar y para lograr la actividad deseada, y pueden comprender la adición, supresión, reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos, y opcionalmente pueden convertirse para contener el codón óptimo dependiendo de la frecuencia del uso de codones en el hospedante.

Cuando la proteína producida por producción secretora de acuerdo con la presente invención es la proteína naturalmente expresada como pro-propéptido, es preferible utilizar el fragmento del gen que codifica la proproteína que contiene la parte de pro-estructura (pro-parte), aunque no es esencial. Cuando se utiliza el gen que codifica una proproteína, la pro-parte de la proteína obtenida como resultado de la expresión del gen puede ser escindida por medios adecuados, por ejemplo por una proteasa. Para esto, pueden utilizarse aminopeptidasas, endopeptidasas que pueden escindir en el sitio apropiado, o utilizarse proteasas más específicas. Es preferible utilizar las proteasas que escinden la proteína de un modo tal que la proteína escindida tiene una actividad equivalente o superior a la de la proteína natural. Alternativamente, la secuencia del gen que codifica la proteína buscada o que codifica la parte de pro-estructura de la proteína buscada también puede modificarse y diseñarse para expresar la proteína que tenga el sitio de reconocimiento para una proteasa, específico para la ubicación deseada. Los procedimientos generales de biotecnología molecular, que incluyen tales técnicas de modificación, técnicas de clonación de genes y técnicas de detección para las proteínas producidas, son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica y puede recurrirse como referencia a Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, DNA Cloning: A Practical Approach, Volumen I y (D. N. Glover ed. 1985), F.

## ES 2 335 750 T3

M. Ausubel *et al.* (Eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994), PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, y etc.

La región N-terminal de la proteína que puede finalmente obtenerse de acuerdo con la presente invención no es necesariamente idéntica a la de la proteína natural y, por lo tanto, uno a varios aminoácidos pueden añadirse a, o eliminarse de, la proteína natural. Cuando se utiliza una proteasa, es preferible que la proteína producida se escinda en aproximadamente la misma posición que la proteína natural, en términos de su actividad y es más preferible que sea idéntica al péptido maduro de una proteína natural. Por lo tanto, son más preferibles las proteasas específicas que escinden el pro-péptido en una posición tal que generan la misma proteína que la proteína madura original. Sin embargo, para un propósito particular, los péptidos que tienen secuencias más extensas o más cortas de residuos de aminoácidos que consisten en uno a varios residuos en el extremo N-terminal, en comparación con el extremo N-terminal de la proteína natural, pueden poseer una actividad más apropiada. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, Dispa (disponible de Boehringer Mannheim Co.) que puede estar comercialmente disponible y proteasas obtenidas a partir del medio de cultivo de microorganismos, tales como, por ejemplo, el medio de cultivo de actinomicetos. Tales proteasas pueden utilizarse en un estado no purificado u, opcionalmente, pueden utilizarse después de haber sido purificadas hasta la pureza apropiada.

Otros ejemplos de proteasas adecuadas para eliminar la pro-parte de protransglutaminasas obtenidas a partir de *Streptomyces* son SAMP45, una serina proteasa producida por *Streptomyces albogriseolus* (de aquí en más puede abreviarse *S. albogriseolus*). La secuencia del gen y la secuencia de aminoácidos de longitud completa codificada (1-13: secuencia señal, 32-76: pro-parte, 77-407: transglutaminasa madura) para la transglutaminasa de *S. mobaraense* se muestra en SEQ ID: 6 y SEQ ID: 7, respectivamente. En el caso de la protransglutaminasa de *S. mobaraense*, dado que SAMP45 escinde entre Ser<sup>72</sup> y Phe<sup>73</sup> en la parte de pro-estructura, la proteína resultante tiene la estructura en la que 4 aminoácidos adicionales (Phe-Arg-Ala-Pro, SEQ ID: 60) obtenidos a partir del extremo C-terminal de la pro-parte, se unen al extremo N-terminal de la transglutaminasa madura natural. Los inventores confirmaron que tales proteínas tienen actividad de transglutaminasa. La secuencia del gen SAMP45 ya ha sido determinada, y la secuencia de aminoácido de la proteína con la parte de pro-estructura adicional (proSAMP45) también se muestra en SEQ ID No: 8 (J. Bacteriol., 179, 430-438 (1997)).

Además, puede obtenerse transglutaminasa madura idéntica a la transglutaminasa natural utilizando la peptidasa específica de prolina producida por *S. mobaraense* (svPEP), que ha sido descubierta por los inventores, junto con SAMP45, que da lugar a la eliminación de los cuatros aminoácidos de Phe-Arg-Ala-Pro añadidos al extremo N-terminal.

Esta svPEP es una enzima que escinde específicamente los péptidos o los análogos de péptidos representados por la siguiente fórmula (I) en el sitio indicado con \* en la fórmula, esto es, en el lado carboxilo terminal del tercer o cuarto residuo de prolina del extremo N-terminal:



en la que Y representa un oligopéptido que consiste en dos o tres residuos de aminoácidos y Z representa un aminoácido, péptido, amida o éster.

La secuencia nucleotídica del gen svPEP y la secuencia de aminoácidos completa codificada se muestran en SEQ ID: 9 y SEQ ID: 10, respectivamente. Cuando se hace reaccionar svPEP sobre la protransglutaminasa junto con una proteasa en forma de caldo de células de *S. mobaraense* o *S. mobaraense*, la parte de pro-estructura puede escindirse completamente, dando lugar a la transglutaminasa madura a partir de la que se elimina completamente la parte de pro-estructura. Alternativamente, la transglutaminasa madura de la que la parte de pro-estructura se elimina completamente puede obtenerse en forma similar cultivando una bacteria corineforme donde se introducen el gen pre-pro svPEP junto con un gen de proteasa dentro de una bacteria corineforme que libera extracelularmente una protransglutaminasa por producción secretora. Además, una transglutaminasa madura que tiene la misma estructura que la de una forma natural puede producirse eficientemente introduciendo, en forma similar, ambos genes SAMP45 y svPEP en una bacteria corineforme a la que se ha introducido un gen de pre-protransglutaminasa, y permitiendo que la bacteria produzca por secreción protransglutaminasa y SAM45 así como svPEP extracelularmente o en la superficie de las células.

El método para introducir las construcciones genéticas que pueden utilizarse en la presente invención en una bacteria corineforme no se limita a métodos particulares, y los métodos generalmente utilizados incluyen, por ejemplo, el método de los protoplastos (Gene, 39, 281-286 (1985)), el método de electroporación (Bio/Technology, 7, 1067-1070 (1989)), etc. La transformante resultante puede cultivarse de acuerdo con los métodos y condiciones convencionales. Por ejemplo, la transformante puede cultivarse con un medio convencional que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes inorgánicas. Opcionalmente, pueden añadirse al medio vestigios de nutrientes orgánicos tales como vitaminas y aminoácidos para lograr un crecimiento mayor.

Pueden utilizarse como fuentes de carbono, carbohidratos tales como glucosa y sacarosa, y pueden utilizarse ácidos orgánicos tales como ácido acético, alcoholes y otros. Pueden utilizarse como fuentes de nitrógeno, amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso, sales de amonio y otros. Como iones inorgánicos, se utilizan opcionalmente, según sea necesario, ion calcio, ion magnesio, ion fósforo, ion potasio, ion ferroso o férrico y otros. El cultivo puede realizarse durante

## ES 2 335 750 T3

aproximadamente 1 a 7 días en condiciones aeróbicas en el intervalo apropiado de pH entre 5,0 y 8,5 y de temperatura entre 15°C y 37°C. Cultivando la transformante en tales condiciones, se produce intracelularmente una gran cantidad de una proteína buscada, y es eficientemente secretada extracelularmente. En general, se sabe que la transglutaminasa es letal cuando se acumula en grandes cantidades en las células de microorganismos, pero, de acuerdo con la presente invención, la transglutaminasa se produce en forma continua sin generar efectos letales, dado que la transglutaminasa que se produce intracelularmente se libera extracelularmente.

Las proteínas que han sido secretadas en el medio de acuerdo con la presente invención pueden aislarse y purificarse a partir de un medio de cultivo incubado de acuerdo con métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden aislarse y purificarse eliminando las células del medio por centrifugación, etc., y empleando después métodos apropiados conocidos tales como salazón, precipitación con etanol, ultrafiltración, cromatografía por filtración en gel, cromatografía en columna por intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de media o alta resolución, cromatografía en fase reversa, cromatografía hidrofóbica o sus combinaciones. Las proteínas secretadas en la superficie de las células de acuerdo con la presente invención pueden aislarse y purificarse usando métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, por ejemplo solubilizando las mismas con concentraciones crecientes de sal o tensioactivos y utilizando después métodos similares a aquellos para las proteínas secretadas en el medio. Además, en algunos casos las proteínas secretadas en la superficie de la célula pueden utilizarse sin solubilización, por ejemplo como enzimas inmovilizadas.

### Ejemplos

La presente invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos, pero estos no deben considerarse una limitación al alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

*Expresión de prepro-transglutaminasa obtenida a partir de S. mobaraense IFO13819 en C. glutamicum ATCC13869*

##### (1) Adquisición del gen de la transglutaminasa proveniente de *S. mobaraense* IFO13819

La secuencia del gen de la transglutaminasa obtenida a partir de la cepa DSMZ *S. mobaraense* ya ha sido determinada [Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998)]. Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 11 y SEQ ID No: 12 se sintetizaron con referencia a la secuencia, y la región que codifica la secuencia de la transglutaminasa madura se amplificó utilizando el método de PCR con el ADN cromosómico de *S. mobaraense* IFO13819 preparado de acuerdo con el procedimiento convencional (el método de Saito & Miura [Biochim., Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]). Para la reacción por PCR, se utilizó ADN polimerasa Pyrobest (Takarashuzo Co. Ltd.) y las condiciones de reacción siguieron el protocolo recomendado por el fabricante.

(SEQ ID No: 11) 5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'.

(SEQ ID No: 12) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'.

##### Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 11 y SEQ ID No: 12: cebador de PCR

Después, se generó la sonda de ADN efectuando la reacción utilizando un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y Kit de Marcación de ADN con Cebador Aleatorio Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se confirmó que el gen de la transglutaminasa estaba presente en el fragmento de aproximadamente 4 kb escindido con la enzima de restricción Sac I por hibridación con transferencia southern utilizando la sonda generada y el ADN cromosómico de *S. mobaraense* IFO13819 de acuerdo con el método convencional, como se describe en Molecular Cloning 2da. edición [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31 (1989)]. Por consiguiente, el fragmento de aproximadamente 4 kb que se había generado por la digestión de Sac I del ADN cromosómico de *S. mobaraense* IFO13819 se recuperó a través de electroforesis en gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio Sac I de pUC18 (Takarashuzo Co. Ltd.) que se introdujo en células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Takarashuzo Co. Ltd.) para generar una biblioteca.

La cepa bacteriana que alberga el plásmido en el que se clonó el fragmento del gen de la transglutaminasa, se obtuvo por exploración de la biblioteca utilizando la sonda de ADN generada con anterioridad para la transglutaminasa por hibridación de colonias, como se describe en Molecular Cloning 2da. edición [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1. 90 (1989)]. El plásmido se recuperó a partir de esta cepa y se designó pUITG. Se determinó la secuencia del fragmento clonado en pUITG, lo que confirmó que el gen de la transglutaminasa de *S. mobaraense* IFO13819 tenía la misma secuencia nucleotídica que el de la transglutaminasa de la cepa DSMZ de *S. mobaraense*.

## ES 2 335 750 T3

La determinación de la secuencia nucleotídica reveló que el fragmento SacI de aproximadamente 4 kb era el fragmento de ADN incompleto del que se eliminó parcialmente la secuencia señal (la pre-parte). Por consiguiente, se intentaron la clonación de la región promotora y de la región de la secuencia señal completa. La clonación se llevó a cabo utilizando el Kit de clonación por PCR *in vitro* TAKARA LA (Takarashuzo Co. Ltd.) y los cebadores sintetizados que se muestran en SEQ ID No: 13 y SEQ ID No: 14 de acuerdo con el protocolo adjunto.

(SEQ ID No: 13) 5'-GTGACCCTGTCGTCGGAGTC-3'

(SEQ ID No: 14) 5'-GGCATCCTGTCGAGCGGCTC-3'

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 13 y SEQ ID No: 14: cebadores de PCR para la región promotora y la secuencia señal de *S. mobaraense*.

En consecuencia, cuando se utilizó un cebador de casete de Sall, se obtuvo el fragmento amplificado por PCR de aproximadamente 800 pb y la secuenciación del fragmento confirmó que el fragmento contenía la región promotora del gen de la transglutaminasa y la región de la secuencia señal. Por consiguiente, el fragmento amplificado por PCR de aproximadamente 800 pb se insertó en el sitio SmaI de pVC7 descrito en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVITGS5. Además, el plásmido pUITG se digirió con SacI, el fragmento de aproximadamente 4 kb se recuperó por electroforesis en agarosa, y el fragmento se insertó en el sitio SacI de pVITGS5 para construir un plásmido pVITGC que contenía el gen de la transglutaminasa de longitud completa. La determinación de la secuencia nucleotídica se llevó a cabo utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems) y el Secuenciador de ADN 373A (PE Applied Biosystems). La secuencia del gen de la preprotransglutaminasa se muestra en SEQ ID No: 6. Se supuso que la secuencia N-terminal de 31 aminoácidos (No: 1-31) era la secuencia señal (la pre-parte), la secuencia N-terminal de 45 aminoácidos (No: 32-76) era la pro-parte y la secuencia N-terminal de 331 aminoácidos (No: 77-407) era la transglutaminasa madura.

(2) *Conversión de la región promotora del gen de la transglutaminasa*

La secuencia del gen para PS2, que es una proteína de superficie de *G. glutamicum*, ya ha sido determinada [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]. Los cebadores que se muestran como SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 16 se sintetizaron con referencia a esa secuencia, y la región que contiene el promotor ubicado en la región del lado 5' del codón de iniciación del gen de la proteína PS2 se amplificó utilizando el método de PCR a partir del ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con un método convencional.

(SEQ ID No: 15)

5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID No: 16)

5'-GAGCTCTCCGGCGTATGCGCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATA-3'

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 16: cebadores de PCR

Por su parte, los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 12 y SEQ ID No: 17 se sintetizaron tomando como base la secuencia del gen de la transglutaminasa determinada en el Ejemplo 1 (1), y la región del gen de la preprotransglutaminasa se amplificó utilizando el método de PCR a partir de pUITG obtenido en el Ejemplo 1(1).

(SEQ ID No: 12) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

(SEQ ID No: 17) 5'-ATGCGCATACGCCGGAGAGCTCTCGTCTTC-3'

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 12 y 17: cebadores de PCR

Después, el gen de fusión de la transglutaminasa fusionado con la parte de pre-proestructura adicional, que se ligó a la región que comprende el promotor del gen de la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 12 utilizando como moldes la

## ES 2 335 750 T3

mezcla de 1  $\mu$ l de cada solución de PCR de la región amplificada que comprende el promotor del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y de la región del gen amplificado de pre-protransglutaminasa. El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se recuperó a partir del gel de agarosa con EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI de pVC7 según se describe en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKPTG0. La secuencia nucleotídica del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método descrito con anterioridad y se confirmó que el gen de fusión se construyó de acuerdo con lo esperado.

### 10 (3) Expresión del gen de la pre-protransglutaminasa en *C. glutamicum* ATCC13869

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el pVITGC construido en el Ejemplo 1(1) (tanto el promotor como el gen de la pre-protransglutaminasa se obtuvieron a partir de *S. mobaraense*) o con el pVKPTGO construido en el Ejemplo 1(2) (el promotor se obtuvo a partir del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y el gen de la pre-protransglutaminasa se obtuvo a partir de *S. mobaraense*) y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol (10 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 5 g de sacarosa, 5 g de NaCl, 5 g de agar por litro de agua destilada). Las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que albergaban pVITGC o pVKPTGO se cultivaron en medio de cultivo MM (30 g de glucosa, 0,4 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 30 g de sulfato de amonio, 1 g de dihidrógeno fosfato de potasio, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidrato, 0,01 g de sulfato de manganeso (II) pentahidrato, 200  $\mu$ g de hidrócloruro de tiamina, 500  $\mu$ g de biotina, 0,15 g de DL-metionina, 50 g de carbonato de calcio por litro de agua destilada, ajustado a pH 7,5) que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez finalizada la incubación, se sometieron 10  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y después a transferencia Western utilizando anticuerpos anti-transglutaminasa, como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) de acuerdo con el método convencional (por ejemplo, el procedimiento general descrito en J. Sambrook *et al.* (1998) (*supra*)).

Por consiguiente, la secreción de transglutaminasa no pudo detectarse. A partir de los resultados anteriores, se confirmó que la secuencia señal de la transglutaminasa de *S. mobaraense* no funcionó en *C. glutamicum* ATCC13869.

### Ejemplo 2

Producción secretora de transglutaminasa utilizando el gen de fusión que codifica el péptido señal de la proteína de superficie celular de *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum* ATCC13869) y la transglutaminasa madura obtenida a partir de *S. mobaraense* IFO13819

(1) Construcción del gen de la transglutaminasa que contiene la secuencia señal de la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

La secuencia del gen de PS2, que es la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869, ya ha sido determinada [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]. Los cebadores que se muestran como SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 18 se sintetizaron con referencia a la secuencia, y la región que codifica los 44 residuos de aminoácidos N-terminales (30 residuos de aminoácidos del péptido señal y 14 residuos de aminoácidos de la proteína de superficie celular madura) de la proteína correspondiente a PS2 y la región del lado 5' que contiene la región promotora, se amplificaron utilizando un método de PCR con el ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1(2). El cebador que se muestra en SEQ ID No: 18 también comprende la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la transglutaminasa madura, para construir el gen de fusión fusionado con transglutaminasa.

(SEQ ID No: 15) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID No: 18) 5'-GGGGTGACCCTGTCGTCGGAGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 15 y 18: cebador de PCR

Por su parte, los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 11 y SEQ ID No: 12 se sintetizaron tomando como base la secuencia del gen de la transglutaminasa determinada en el Ejemplo 1(1), y la región del gen de la transglutaminasa madura se amplificó utilizando el método de PCR con el pUITG obtenido en el Ejemplo 1(1).

El gen de fusión de la transglutaminasa madura, que se conectó a la región que codifica los 44 residuos de aminoácidos N-terminales de *C. glutamicum* ATCC13869 y a la región del lado 5' que comprende el gen promotor del gen de la proteína de superficie celular, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 12 utilizando como moldes la mezcla de 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada que codifica los 44 residuos

## ES 2 335 750 T3

de aminoácidos N-terminales de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* y de la región amplificada del lado 5' que contiene el promotor, y 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada del gen de transglutaminasa madura.

5 El fragmento amplificado de aproximadamente 1,7 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó a partir del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI del pVC7 según se describe en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKPTG3. La secuencia nucleotídica del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método descrito con anterioridad y se confirmó la construcción del gen de fusión esperado.

10

Además, el gen de fusión de transglutaminasa madura de aproximadamente 1,7 kb, que se había ligado a la región que codifica los 44 residuos de aminoácidos N-terminales de *C. glutamicum* ATCC13869 y a la región del lado 5' que comprende el promotor del gen de la proteína de superficie celular, se escindió por digestión de pVKTG2 con KpnI y XbaI y se recuperó utilizando electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se insertó en el sitio KpnI-XbaI del pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322774 para construir pPKTG3.

15

(2) *Secreción de transglutaminasa madura utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. glutamicum ATCC13869*

20

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido pVKTG3 o pPKTG3 construido (en ambos casos, el gen que comprende el promotor y el gen que codifica el péptido señal y los 14 residuos de aminoácidos N-terminales se obtuvieron a partir de *C. glutamicum* ATCC13869, y el gen de la transglutaminasa madura se obtuvo a partir de *S. mobaraense*) y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S que comprendía 5 mg/l de cloranfericol o 25 mg/l de kanamicina. Después, las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que contenían pVITG3 o pVPKTG3 se cultivaron en un medio de cultivo líquido MM, descrito con anterioridad, que comprendía 5 mg/l de cloranfericol o 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez finalizada la incubación, se sometieron 10  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y después se realizó una transferencia Western, de acuerdo con un método convencional, utilizando anticuerpos anti-transglutaminasa, como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994). Como consecuencia, pudo detectarse, en el sobrenadante del cultivo de ambas cepas, una pequeña cantidad de transglutaminasa secretada que tenía un peso molecular similar al de la transglutaminasa madura.

25

30

### 35 Ejemplo 3

*Producción secretora de pro-transglutaminasa utilizando el gen de fusión de pro-transglutaminasa (gen de fusión de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado) obtenido a partir de S. mobaraense IFO13819 ligado al péptido señal de la proteína de superficie celular de C. glutamicum ATCC13869*

40

(1) *Construcción del gen de la transglutaminasa (gen de fusión de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado) que contiene la parte de pro-estructura adicional con el péptido señal de la proteína de superficie celular de C. glutamicum ATCC13869*

45

50

Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 19, SEQ ID No: 20, SEQ ID No: 21 y SEQ ID No: 22 se sintetizaron con referencia a la secuencia del gen de PS2 que era la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]. La región codificadora para los 30, 31, 44 o 68 residuos de aminoácidos N-terminales (la región comprende 30 residuos de aminoácidos del péptido señal) y la región del lado 5' que contiene la región promotora de la proteína correspondiente a PS2 se amplificaron respectivamente por el método de PCR utilizando la combinación de SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 19, o de SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 20, o de SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 21, o de SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 22 del ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1(2).

55

Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 19, SEQ ID No: 20, SEQ ID No: 21 y SEQ ID No: 22 comprenden las secuencias que codifican los aminoácidos N-terminales de la pro-transglutaminasa, para construir el gen de fusión fusionado con la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura.

(SEQ ID No: 15) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

60

(SEQ ID No: 19) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCAGCGAATGCTGGGATAGCAACGCC-3'

(SEQ ID No: 20) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCCTGAGCGAATGCTGGGATAGCTAC-3'

(SEQ ID No: 21) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

65

(SEQ ID No: 22) 5'-CTTGCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCAGTCAGGTCGCGGAGGGTTTCCTC-3'

## ES 2 335 750 T3

Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 15, 19, 20, 21 y 22: cebadores de PCR

5 Por su parte, los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 23 y SEQ ID No: 12 se sintetizaron tomando como base la secuencia del gen de la transglutaminasa determinada en el Ejemplo 1(1), y la región del gen de la pro-transglutaminasa se amplificó utilizando el método de PCR con el pUITG obtenido en el Ejemplo 1(1).

(SEQ ID No: 12) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

10

(SEQ ID No: 23) 5'-GACAATGGCGCGGGGGAAGAGACGAAGTCC-3'

15 Texto libre de listado de secuencias

15

SEQ ID No: 22 y 23: cebadores de PCR

20 Después, el gen de la pro-transglutaminasa heterológamente ligado a la región respectiva que codifica sus 30, 31, 44 o 68 residuos de aminoácidos N-terminales y a la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, esto es, los fragmentos de genes de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionados que se ligaron al promotor del gen de la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 12 utilizando como moldes la mezcla que comprende 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y una de las regiones amplificadas que codifican 30, 31, 44 o 68 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína, y 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada del gen para la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura.

25

30 Los fragmentos amplificados que oscilan entre aproximadamente 1,8 kb y 1,9 kb se detectaron por electroforesis en agarosa. Estos fragmentos se recuperaron a partir del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertaron en el sitio SmaI del pVC7 según se describe en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKPTG1, pVKPTG2, pVKPTG3 y pVKPTG4, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos insertados se determinaron de acuerdo con el método mencionado con anterioridad y se confirmó que los genes de fusión eran los esperados.

35 Además, los genes de fusión de aproximadamente 1,8 kb a 1,9 kb de la transglutaminasa que tienen las partes de la pro-estructura, que se habían ligado a la región respectiva que codifica los 30, 31, 44 o 68 residuos de aminoácidos y a la región del lado 5' que comprende la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum*, se escindieron por digestión de pVKTG1, pVKTG2, pVKTG3 o pVKTG4, respectivamente, con KpnI y XbaI, y se recuperaron por electroforesis en gel de agarosa. Estos fragmentos se insertaron en el sitio KpnI-XbaI de pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322774 para construir pPKTG1, pPKTG2, pPKTG3 y pPKTG4.

40

(2) *Secreción de pro-glutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. glutamicum* ATCC13869

45

50 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido pVKTG1, pVKTG2, pVKTG3, pPKTG4, pPKPTG1, pPKPTG2, pPKPTG3 o pPKPTG4 y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S, descrito con anterioridad, que comprendía 5 mg/l de cloranfericol o 25 mg/l de kanamicina. Después, las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que albergaban pVKTG1, pVKTG2, pVKTG3, pPKTG4, pPKPTG1, pPKPTG2, pPKPTG3 o pPKPTG4 se cultivaron en medio de cultivo MM, descrito con anterioridad, que comprendía 5 mg/l de cloranfericol o 25 mg/l de kanamicina, a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez finalizada la incubación, se sometieron 10  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y después se realizó una transferencia Western, de acuerdo con un método convencional, utilizando anticuerpos anti-transglutaminasa, como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994). Como consecuencia, se confirmó para ambos vectores (pVC7 o pPK4) la secreción de una cantidad similar de transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura, y se observaron diferencias significativas en la cantidad secretada dependiendo de la longitud de los residuos de aminoácidos N-terminales de la forma madura de la proteína correspondiente a PS2. Las cantidades secretadas representativas se muestran en la Tabla 1.

55

60 TABLA 1

Cantidad secretada de pro-transglutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

65

Plásmido	Pro-transglutaminasa (mg/l)
pPKPTG1	78
pPKPTG4	210

## ES 2 335 750 T3

### Ejemplo 4

Producción secretora de pro-transglutaminasa utilizando el gen de fusión que tiene la secuencia que codifica la secuencia señal de la proteína de superficie celular de *C. ammoniagenes* y la pro-transglutaminasa obtenida a partir de *S. mobaraense* IFO13819

(1) Construcción del gen de la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura adicional y la secuencia señal de la proteína de superficie celular de *C. ammoniagenes* (gen de fusión de preprotransglutaminasa heterológamente fusionado)

Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 24 y SEQ ID No: 25 se sintetizaron con referencia a la secuencia del gen de la proteína de superficie celular (SIpA) [JP-Kokai No. 10-108675] de *C. ammoniagenes* y la región que comprende la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína de superficie celular (SIpA) y la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales (el péptido señal) de SIpA, se amplificaron utilizando el método de PCR del ADN cromosómico de *C. ammoniagenes* preparado de acuerdo con el método convencional. El cebador que se muestra en SEQ ID No: 25 también comprende la secuencia que codifica los aminoácidos N-terminales de la pro-transglutaminasa, para construir el gen de fusión fusionado con la pro-transglutaminasa.

(SEQ ID No: 24) 5'-GCCCAGAAGCCCAAATTGAGATTT-3'

(SEQ ID No: 25) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCGCGCCATTGTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCAGC-3'

Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 23 y 24: cebadores de PCR.

El gen de fusión de la transglutaminasa que contiene la parte de pro-estructura adicional que se ligó a la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de *C. ammoniagenes* y a la región del lado 5' que comprende la región promotora del gen de la proteína de superficie celular (SIpA) (gen de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado), se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 24 y SEQ ID No: 12 utilizando la mezcla, como molde, que contenía 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región del lado 5' amplificada que contiene la región promotora del gen de la proteína de superficie celular (SIpA) y la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región del gen para la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura adicional que había sido amplificada en el Ejemplo 3(1). El fragmento amplificado de aproximadamente 1,7 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI del pVCT7 para obtener pVSPTG1.

(2) Conversión de la región promotora: Ligación con el promotor del gen de la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 26 se sintetizaron con referencia a la secuencia del gen de PS2 que es la proteína de superficie celular [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)] de *C. glutamicum*. La región del lado 5' que comprende la región promotora del gen para la proteína correspondiente a PS2 se amplificó utilizando el método de PCR a partir del ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con el método del Ejemplo 1(2). El cebador que se muestra en SEQ ID No: 26 también comprende la secuencia que codifica los aminoácidos N-terminales de la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* para construir el gen de fusión con el gen de la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura conectada a la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* (gen de fusión de prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado).

(SEQ ID No: 15) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID No: 26) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAGAGCGAAGGCTCCTTGAATAGGT-3'

Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 15, 26: cebador de PCR

Por su parte, los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 27 y SEQ ID No: 12 se sintetizaron tomando como base la secuencia del gen de fusión de la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura adicional y la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes*. Después, la región de la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura adicional se amplificó utilizando el método de PCR a partir del pVSPTG1 obtenido en el Ejemplo 4(1) con los cebadores.

## ES 2 335 750 T3

(SEQ ID No: 12) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

(SEQ ID No: 27) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGCTGCGGCG-3'

5

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 12, 27: cebadores de PCR

10 Después, el gen de fusión de la transglutaminasa que tiene la parte de pre-proestructura, que se ligó a la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y a la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 15 y SEQ ID No: 12 utilizando la mezcla que comprendía 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región del lado 5' amplificada que contiene la región promotora del gen para la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* y 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada del gen para la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura que tenía la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* (gen de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado).

20 El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó a partir del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI del pVC7 descrito en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKSPTG1. La secuencia nucleotídica del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método mencionado con anterioridad y se confirmó la construcción del gen de fusión esperado.

25 El gen de fusión de aproximadamente 1,8 kb para transglutaminasa que tiene la pro-estructura, que se ligó a la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales (péptido señal) de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y que comprendía la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, se escindió por digestión de pVKSPTG1 con KpnI y XbaI, y el fragmento se recuperó utilizando electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se insertó en el sitio KpnI-XbaI del pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322.774 para construir pPKSTG1. Ambos plásmidos, pVKSPTG1 y pPKSTG1, contenían el promotor obtenido a partir del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, el gen del péptido señal obtenido a partir de SIpA de *C. ammoniagenes* y el gen de la transglutaminasa obtenido a partir de *S. mobaraense*.

35 (3) *Conversión a un promotor tac de E. coli*

Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 28 y SEQ ID No: 29 se sintetizaron tomando como base la secuencia del plásmido pKK223-3 (Amersham Pharmacia Co. Ltd.) en el que se había clonado el promotor tac de *E. coli*. La región correspondiente al promotor tac se amplificó utilizando el método de PCR a partir de ADN pKK223-3. El cebador que se muestra en SEQ ID No: 29 también comprende la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos N-terminal de la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* para construir el gen de fusión que tiene la parte de pro-estructura, que contenía la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* (gen de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado).

45 (SEQ ID No: 28) 5'-GGATCCGGAGCTTATCGACTGCACG-3'

(SEQ ID No: 29) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAATTCAGTTTCTGTGTGAAATTGT-3'

50 *Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 28 y 29: cebadores de PCR

55 El gen de fusión para la transglutaminasa que tiene la parte de pre-proestructura adicional, que se ligó a la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y que contenía el promotor tac (gen de la transglutaminasa heterológamente fusionado), se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 28 y SEQ ID No: 12 utilizando como moldes la mezcla de 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada correspondiente al promotor tac y 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada del gen para la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura, que contenía la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes*. El fragmento amplificado de aproximadamente 1,5 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa por EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI del pVC7 descrito en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVTSPTG1. La secuencia nucleotídica del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método mencionado con anterioridad y se confirmó la construcción del gen de fusión esperado.

65 El gen de fusión de aproximadamente 1,5 kb para la transglutaminasa que tiene la pro-estructura, que se ligó a la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y el promotor tac, se escindió por digestión de pVTSPTG1 con KpnI y XbaI y se recuperó utilizando

## ES 2 335 750 T3

electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se insertó en el sitio KpnI-XbaI del pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322774 para construir pPTSPTG1. Ambos plásmidos, pVTSPTG1 y pPTSPTG1, contenían el promotor tac obtenido a partir de *E. coli*, el gen del péptido señal obtenido a partir de SIpA de *C. ammoniagenes* y el gen de la pro-transglutaminasa obtenido a partir de *S. mobaraense*.

5

(4) *Secreción de pro-transglutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes*

10 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido construido pVKSPTG1, pVTSPTG1, pPKSPTG1 o pPTSPTG1 y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S que comprendía 5 mg/l de cloranfericol o 25 mg/l de kanamicina. Después, las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que albergaban pVKSPTG1, pVTSPTG1, pPKSPTG1 o pPTSPTG1 se cultivaron en el medio de cultivo MM mencionado con anterioridad que comprendía 5 mg/l de cloranfericol o 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. 15 Una vez finalizado el cultivo, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y después se llevó a cabo una transferencia Western, de acuerdo con un método convencional, utilizando anticuerpos anti-transglutaminasa, como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994). Como consecuencia, se confirmó la secreción de una cantidad similar de transglutaminasa por parte de cualquiera de los vectores, pVC7 o pPK4. Las cantidades representativas de la secreción se muestran en la Tabla 2.

20

TABLA 2

Cantidad secretada de pro-transglutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de *C. ammoniagenes* ATCC13869

25

Plásmido	Pro-transglutaminasa (mg/l)
pPKSPTG1	102
pPTSPTG1	74

30

### Ejemplo 5

35

*Producción secretora de pro-transglutaminasa utilizando el gen de fusión que contiene la secuencia que codifica la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes y la pro-transglutaminasa obtenida a partir de Streptovercillium cinnamoneum IFO12852*

40

(1) *Construcción del gen de fusión que comprende la secuencia que codifica la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes y la secuencia que codifica la pro-transglutaminasa obtenida a partir de S. cinnamoneum IFO12852*

45

La secuencia del gen de la transglutaminasa de *S. cinnamoneum* IFO12852 ha sido determinada [Solicitud de Patente japonesa No. 11-295649]. Se presume que la región desde la posición 1 a la posición 32 de la secuencia de aminoácidos es la secuencia para la pre-parte, se presume que desde la posición 33 a la posición 86 es la secuencia para la pro-parte, y se presume que desde la posición 87 a la posición 416 es la secuencia para la secuencia de la transglutaminasa madura. La secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos completa se muestran en SEQ ID No: 30 y SEQ ID No: 31. Además, *Escherichia coli* AJ13669, que se había transformado con el plásmido pUJ-MTG que contiene el gen, ha sido originalmente depositada en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (Actualmente, Agencia Administrativa Independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón) el 14 de octubre de 1999 como FERM P-17602 y ha sido transferida al depósito según el Tratado de Budapest el 28 de agosto de 2000, y le ha sido asignado el número de depósito de FERM BP-7287.

55

La región de 3,5 kb que cubre toda la longitud del gen de la prepro-transglutaminasa primero se escindió de pUJ-MTG con la enzima de restricción BamHI, y se generó pUCSCTG, donde la región se insertó en el sitio BamHI de pUC19.

60

Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 32 y SEQ ID No: 33 se sintetizaron, y la región del gen que comprende la pro-transglutaminasa obtenida a partir de *S. cinnamoneum* IFO12852 se amplificó por el método de PCR utilizando pUCSCTG como molde, según lo previamente descrito.

65

(SEQ ID No: 32) 5'-GGC GAT GGG GAA GAG AAG GGG-3'

(SEQ ID No: 33) 5'-GGC GGA TCC TVG CGT CGA GAG GCG TGG ACT GA-3'

## ES 2 335 750 T3

### Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 32 y 33: cebadores de PCR

5 Después, la región, que contenía la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen PS2 que es la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* y la región que contiene la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes*, se amplificó llevando a cabo una PCR utilizando la combinación de SEQ ID No: 34 y SEQ ID No: 35 de pPKSPTG1, que se construyó en el Ejemplo 4(2) como molde.

10 El cebador que se muestra en SEQ ID No: 35 también contenía la secuencia codificadora de la secuencia de aminoácidos N-terminal de pro-transglutaminasa obtenida a partir de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852, para construir el gen de fusión con la transglutaminasa obtenida a partir de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852.

(SEQ ID No: 34) 5'-TAC GAA TTC GAG CTC GGT ACC-3'

15 (SEQ ID No: 35) 5'-CCC CTT CTC TTC CCC ATC GCC TGC CGT TGC CAC AGG TGC GGC C-3'

### Texto libre de listado de secuencias

20 SEQ ID No: 34 y 35: cebadores de PCR

25 El fragmento del gen de la prepro-transglutaminasa heterológamente fusionado, que se ligó a la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y a la región del lado 5' que comprende la región promotora del gen PS2, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 34 y SEQ ID No: 33 utilizando como moldes la mezcla que contenía 1 µl de solución de PCR de la región amplificada que codifica el gen para la pro-transglutaminasa obtenida a partir de *C. cinnamoneum* IFO12852 y 1 µl de solución de PCR de la región amplificada que comprende la región del lado 5' que contenía la región promotora del gen PS2 y la región que contenía la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes*.

30 El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se digirió con EcoRI y BamHI, y después se recuperó del gel de agarosa y se insertó en el sitio EcoRI-BamHI del pUC19 para obtener pUKSPTG2'. La secuencia del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método mencionado con anterioridad y se confirmó que el gen de fusión se construyó según lo esperado. Este pUKSPTG2' se digirió con EcoRI y se cortó para producir extremos romos con un Blunting Kit (kit para producir extremos romos) (Takarashuzo Co. Ltd.) y el conector XbaI (Takarashuzo Co. Ltd.) que tiene la secuencia 5'-CTCTAGAG-3', en la que el extremo 5'-terminal se fosforiló, después se insertó y se recicló para construir pUKSPTG2. El gen fusionado de transglutaminasa de aproximadamente 1,8 kb (el gen de la transglutaminasa se obtuvo a partir de *S. cinnamoneum* IFO12852) se escindió por digestión de pUKSPTG2 con XbaI y se recuperó utilizando electroforesis en gel de agarosa. Estos fragmentos se insertaron en el sitio XbaI del pPK4 descrito con anterioridad para construir pPKSPTG2.

40 Se construyó el gen de la preprotransglutaminasa que tiene una parte de pro-estructura quimérica, en la que el extremo N-terminal de la parte de pro-estructura fue parcialmente reemplazada por la parte de pro-estructura de *S. mobaraense* (el gen de la transglutaminasa madura y la parte de pro-estructura se obtuvieron a partir de *S. cinnamoneum* IFO12852).

45 En primer lugar, el fragmento de aproximadamente 1,8 kb, que contenía el gen de la prepro-transglutaminasa de EcoRI-BamHI, se escindió del plásmido pPKSPTG1 (para la expresión de la pro-transglutaminasa obtenida a partir de *S. mobaraense* IFO13819) que se construyó en el Ejemplo 4(2), y el fragmento se insertó en el sitio EcoRI-BamHI de pUC19 (pUKSPTG1). El fragmento de aproximadamente 1,2 se escindió por digestión de pUKSPTG1 con AatII, y pUKSPTG2' también se digirió con AatII para preparar el fragmento de aproximadamente 3,3 kb por eliminación del fragmento de aproximadamente 1,2 kb. Este fragmento de aproximadamente 3,3 kb se ligó al fragmento AatII de aproximadamente 1,2 kb obtenido a partir de pUKSPTG1, y se seleccionaron clones, de acuerdo con las técnicas de ingeniería genética convencionales, en los que se insertó el fragmento AatII. Para determinar la orientación del fragmento AatII insertado en los clones, los clones se secuenciaron en serie y se seleccionaron los clones (pUKSPTG3') en los que el fragmento se insertó en la orientación deseada (para codificar la preprotransglutaminasa).

50 Además, el sitio EcoRI de pUKSPTG3' también se cortó para producir extremos romos como se describió para pUKSPTG2' y se insertó el conector XbaI para construir pUKSPTG3. Además, el fragmento XbaI de 1,8 kb escindido de pUKSPTG3 se insertó en el sitio XbaI de pPK4 para construir pPKSPTG3.

65 (2) *Secreción de la pro-transglutaminasa obtenida a partir de Streptovercillium cinnamoneum IFO12852 utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes*

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido pPKSPTG2 o pPKSPTG3, y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S descrito con anterioridad que comprendía 25 mg/l de kamamicina. Después,

## ES 2 335 750 T3

las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que albergaban pPKSPTG2 o pPKSPTG3 se cultivaron respectivamente en medio de cultivo líquido MMTG (60 g de glucosa, 0,4 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 30 g de sulfato de amonio, 1 g de dihidrógeno fosfato de potasio, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidrato, 0,01 g de sulfato de manganeso (II) pentahidrato, 450 µg de hidrócloruro de tiamina, 450 µg de biotina, 0,15 g de DL-metionina, 50 g de carbonato de calcio por litro de agua destilada, ajustado a pH 7,5) que contenía 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 3 días. Una vez completado el cultivo, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y después se llevó a cabo un análisis por transferencia Western, de acuerdo con el método convencional, utilizando anticuerpos anti-transglutaminasa, de acuerdo con lo descrito con anterioridad. Este anticuerpo era un anticuerpo para la transglutaminasa obtenida a partir de *S. mobaraense*, sin embargo también mostró reactividad frente a la transglutaminasa obtenida a partir de *S. cinnamoneum*. Por consiguiente, se confirmó la secreción (aproximadamente 30 a 50 mg/l) de la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura obtenida a partir de *S. cinnamoneum* IFO12852.

### 15 Ejemplo 6

*Clonación del gen de la serina proteasa (SAMP45), y la construcción y evaluación de plásmidos de expresión*

(1) *Construcción del gen de la serina proteasa (SAMP45) que tiene la parte de pro-estructura y la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes (gen de la prepro-serina proteasa (SAMP45) heterológamente fusionado)*

La secuencia del gen de SAMP45 que es una serina proteasa producida por *S. albogriseolus* [J. Bacteriol., 179, 430-438(1997)] ya ha sido determinada. Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 36 y SEQ ID No: 37 se sintetizaron con referencia a esta secuencia y la región del gen que contiene la parte de pro-estructura N-terminal de SAMP45, la SAMP45 madura y la parte de pro-estructura C-terminal, se amplificaron utilizando el método de PCR de acuerdo con lo descrito con anterioridad.

(SEQ ID No: 36) 5'-AACGGGGAGAACAGCACGGCCGCGG-3'

(SEQ ID No: 37) 5'-GGCGAATTCTCCGGCGGGCCGTCACCGGT-3'

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 36 y 37: cebadores de PCR

La región que comprende la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína PS2 de superficie celular de *C. glutamicum* y la secuencia señal de la proteína SIpA de superficie celular de *C. ammoniagenes* se amplificó en forma similar utilizando el método de PCR con la combinación de SEQ ID No: 38 y SEQ ID No: 39, utilizando el pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4(2) como molde.

El cebador que se muestra en SEQ ID No: 39 comprende la secuencia que codifica los aminoácidos N-terminales de la pro-serina proteasa para construir el gen de fusión que contiene la serina proteasa, que tiene la parte de pro-estructura.

(SEQ ID No: 38) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(SEQ ID No: 39) 5'-CGGCCGTGCTGTTCTCCCGTTTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCC-3'

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 38 y 39: cebadores de PCR para construir el gen de la pro-serina proteasa.

Después, el fragmento génico del gen de la prepro-serina proteasa heterológamente fusionado, que se ligó a la secuencia señal de la proteína SIpA de superficie celular de *C. ammoniagenes* y a la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen PS2, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 38 y SEQ ID No: 37 utilizando la mezcla, como moldes, que comprendía 1 µl de solución de PCR de la región amplificada que comprende el gen para la pro-estructura N-terminal de SAMP45, la SAMP45 madura y la pro-estructura C-terminal, y 1 µl de solución de PCR de la región amplificada que comprende la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen PS2 y la secuencia señal de la proteína SIpA de superficie celular de *C. ammoniagenes*, respectivamente.

El fragmento amplificado de aproximadamente 3,9 kb se detectó por electroforesis en gel de agarosa. El producto de PCR se digirió con HindIII y EcoRI, después se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de aproximadamente 3,9 kb se recuperó del gel de agarosa utilizando y se insertó en el sitio HindIII-EcoRI del pVC7 mencionado con anterioridad, para para obtener pVSS1, respectivamente. La secuencia del fragmento insertado se

## ES 2 335 750 T3

determinó de acuerdo con el método mencionado con anterioridad y se confirmó que el gen de fusión se construyó según lo esperado.

### 5 (2) *Secreción de la serina-proteasa utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes*

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido pVSS1 y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S, descrito con anterioridad, que comprendía 5 mg/l de cloranfericol. Después, las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que contenían pVSS1 se cultivaron en un medio de cultivo MMTG, que comprendía 5 mg/l de cloranfericol a 30°C durante 70 horas. Se separó en el sobrenadante del medio de cultivo, 1 ml del medio de cultivo y las células mediante centrifugación. Las células se suspendieron en un tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0). La actividad de la serina proteasa se determinó de la siguiente manera: se añadieron 50  $\mu$ l del sobrenadante del medio de cultivo o de la suspensión celular a un tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) que contenía Bz-Phe-Val-Arg-pNA (Bachem Co. Ltd.) 0,25 mM para dar una cantidad total de 0,06 ml, que se mantuvo a 30°C durante 20 minutos. Después, la reacción se detuvo tras la adición de 0,4 ml de ácido acético al 50%. Se midió la absorbancia a 410 nm y se midió la cantidad de p-NA (p-nitroanilida) liberada para determinar la actividad. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de p-NA por minuto. Como consecuencia, la actividad de la serina proteasa no se detectó en el sobrenadante del medio de cultivo, pero se detectó en la suspensión celular. Realizando cálculos a partir de los valores de actividad detectada y de los valores de la actividad específica informados en la literatura [J. Bacteriol., 179, 430-438(1997)], se confirmó la expresión y secreción en la superficie de la célula de tanto como aproximadamente 9 mg/l de serina proteasa.

### 25 Ejemplo 7

*Clonación del gen de la peptidasa específica de prolina (svPEP), y construcción y evaluación de plásmidos de expresión*

### 30 (1) *Purificación y análisis de los aminoácidos N-terminales de la peptidasa específica de prolina (svPEP) producida por S. mobaraense IFO13819*

Se colocaron 800 ml de medio de cultivo líquido ISP2 (4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de glucosa y llenando con agua hasta 1 litro, ajustado a pH 7,3) en un matraz Sakaguchi de 5 L y se inoculó *S. mobaraense* IFO13819 desde la placa hacia el matraz y se cultivó agitando el matraz a 30°C durante 48 horas a 120 rpm.

El medio de cultivo se centrifugó para eliminar el sobrenadante del cultivo y las células se cosecharon. Después de lavar las células con un tampón TrisHCl 20 mM que contenía 25 mg/l de kanamicina, las células resultantes se suspendieron en un tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) que contenía 25 mg/l de kanamicina. La suspensión se agitó sobre hielo durante 4 horas y se centrifugó para dar el sobrenadante, que se recolectó. Después de esterilizar por filtración el sobrenadante utilizando un filtro de nitrocelulosa (con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m, Sartrius Co. Ltd.), el sobrenadante se pasó a través de una columna (1,6  $\phi$  x 10 cm) de Butil-Sefarosa 4FF (Amersham Pharmacia Co. Ltd.), que se había pre-equilibrado con sulfato de amonio 1,5 M/tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0), utilizando FPLC (Amersham Pharmacia Co. Ltd.), y se eluyó por medio de un gradiente lineal de sulfato de amonio 1,5 a 0 M en el mismo tampón. Las fracciones que contenían componentes activos se combinaron y pasaron a través de una columna de Fenil-Sefarosa HP (1 ml, Amersham Pharmacia Co. Ltd.) en las mismas condiciones, y las fracciones activas se combinaron y dializaron hasta el día siguiente contra un tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) a 4°C para dar una solución de enzima parcialmente purificada. La solución de enzima parcialmente purificada se sometió a una cromatografía en fase reversa para mayor purificación. Las condiciones de la cromatografía en fase reversa fueron las siguientes:

Dispositivo de HPLC: bomba: HITACHI L-6300, detector: L-4000H

55 Columna: PROTEIN C4 214TP5410 (VYDAC Co. Ltd.)

Elución: La elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de acetonitrilo 24-40%/ácido trifluoroacético 0,1% (20 min.) a temperatura ambiente

60 Caudal de flujo: 1,0 ml/min.

Longitud de onda de detección: 280 nm.

65 La muestra de enzima que se purificó en las condiciones descritas con anterioridad se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un Cartucho de Membrana (Perkin Elmer Co. Ltd.), y la secuencia de aminoácidos N-terminal se analizó utilizando un Secuenciador de Proteínas PPSQ-10 (Shimazu Seisakusho Co., Ltd.)

## ES 2 335 750 T3

en fase gaseosa. Como consecuencia, se determinaron los 20 residuos de aminoácidos N-terminales que se muestran en la SEQ ID No: 40.

5  
 (SEQ ID No: 40) Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro  
 1 5 10  
 10 Gly Met Lys Phe Val Glu Glu Lys  
 15 20

15 (2) *Adquisición del gen de la peptidasa específica de prolina (svPEP) obtenido a partir de S. mobaraense IFO13819*

Se seleccionó la región que se deduce de la secuencia N-terminal determinada de aminoácidos de svPEP y que tiene una menor degeneración, Lys-Ile-Pro-Gly-Met-Lys-Phe-Val-Glu-Glu-Lys (SEQ ID No: 41), y se generó el oligonucleótido sintético que se muestra en SEQ ID No: 42. El ADN cromosómico de *S. mobaraense* IFO13819, preparado de acuerdo con el método convencional, se digirió con diversas enzimas de restricción que reconocen secuencias de 6 nucleótidos y después se analizó por un método de hibridación por transferencia Southern utilizando este oligonucleótido sintético como sonda, y en consecuencia se detectó por escisión de SaCI una banda simple de aproximadamente 6 kb. Por consiguiente, el ADN cromosómico de *S. mobaraense* IFO13819, preparado de acuerdo con el método mencionado con anterioridad, se digirió con SaCI y el fragmento de aproximadamente 6 kb se recuperó por electroforesis en gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.). El fragmento recuperado se insertó en el sitio SaCI de pUC18, que se introdujo en la célula competente de *Escherichia coli* JM109 (Takarashuzo Co. Ltd.), produciendo así una biblioteca. La biblioteca así generada se exploró en busca de la cepa que albergaba el plásmido en el que se clonó el fragmento del gen svPEP, por exploración de la biblioteca a través de hibridación de colonias utilizando el oligonucleótido sintético marcado con <sup>32</sup>P que se muestra en SEQ ID No: 38 como sonda para obtener el gen buscado. El plásmido recuperado a partir de esta cepa se designó pUMP1.

(SEQ ID No: 42) 5'-AAGATCCCCGGGATGAAGTTCGTCGAGGAGAAG-3'

35 *Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 42: una sonda para svPEP

40 Se determinó la secuencia nucleotídica del fragmento que se clonó como pUMP1. Se dedujo la secuencia de aminoácidos codificada por este gen y se halló la secuencia de aminoácidos N-terminal (20 residuos), previamente determinada, tomando como base la proteína enzimática, y se determinó la totalidad de la secuencia primaria de aminoácidos que contiene la secuencia señal putativa y la parte de pro-estructura de svPEP, que se muestra en SEQ ID No: 9. En la secuencia de aminoácidos, se supone que la posición 1 a 25 es la secuencia señal, se supone que la posición 26 a 33 es la pro-estructura y que la posición 34 a 477 es la svPEP madura.

50 La *Escherichia coli* AJ13669 que se transformó con pUMP1 ha sido depositada en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (Actualmente, Agencia Administrativa Independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón) el 15 de mayo de 2000, como FERM BP-7160 según el Tratado de Budapest.

55 (3) *Construcción del gen de la peptidasa específica de prolina (svPEP) que tiene la parte de pro-estructura con la secuencia señal de la proteína de superficie celular de C. ammoniagenes (gen de la peptidasa específica de prepro-prolina (svPEP) heterológamente fusionado)*

60 Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 43 y SEQ ID No: 44 se sintetizaron con referencia a la secuencia de svPEP determinada en el Ejemplo 7(2), y la región del gen que contiene la pro-parte de svPEP y la svPEP madura se amplificaron por el método de PCR de igual manera que la descrita previamente, utilizando como molde el pUMP1 construido en el Ejemplo 7(2).

(SEQ ID No: 43) 5'-GAGGCGGCGTCGATCACCGCCCC-3'

65 (SEQ ID No: 44) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGGCGGCGGCACCCGG-3'

## ES 2 335 750 T3

### Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 43 y 44: cebadores de PCR

5 Después, la región que comprende la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen PS2, que es el gen de la proteína de superficie celular de *C. glutamicum* y la región que contiene la secuencia señal de la proteína SIpA de superficie celular de *C. ammoniagenes*, se amplificó por el método de PCR a partir de pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4(2), como la plantilla, utilizando como molde la combinación de SEQ ID No: 38 y SEQ ID No: 45.

10 El cebador que se muestra en SEQ ID No: 45 comprende la secuencia que codifica los aminoácidos N-terminales de svPEP, para construir el gen de fusión fusionado a la svPEP que tiene la parte de pro-estructura.

(SEQ ID No: 38) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGGCTGA-3'

15 (SEQ ID No: 45) 5'-GGGGCGGTGATCGACGCCGCTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCA-3'

### Texto libre de listado de secuencias

20 SEQ ID No: 38 y 45: cebadores de PCR

Después, el fragmento del gen de la prepro-svPEP heterológamente fusionado, que se ligó a la secuencia señal de la proteína SIpA de superficie celular de *C. ammoniagenes* y a la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen PS2, se amplificó llevando a cabo una PCR cruzada con SEQ ID No: 38 y SEQ ID No: 44 utilizando como moldes de la mezcla que comprendía 1  $\mu$ l de cada solución de PCR de la región que contiene el gen que codifica la parte de pro-estructura de svPEP y la svPEP madura, que se amplificaron respectivamente, y 1  $\mu$ l de solución de PCR de la región amplificada que comprende la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen PS2 y la secuencia señal de la proteína SIpA de superficie celular de *C. ammoniagenes*.

30 (SEQ ID No: 38) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTTA-3'

(SEQ ID No: 44) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGCACCCGG-3'

### 35 Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 38 y SEQ ID No: 44: cebadores de PCR

40 El fragmento amplificado de aproximadamente 2,1 kb se detectó por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de PCR se digirió con HindIII y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de aproximadamente 2,1 kb se recuperó del gel de agarosa y se insertó en el sitio HindIII del pVSS1 descrito en el Ejemplo 6(1) para obtener pVSSSP1, respectivamente. La secuencia del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método convencional y se confirmó la construcción del gen de fusión buscado.

45 (4) Secreción de la peptidasa específica de prolina utilizando la secuencia señal de la proteína de superficie celular de *C. ammoniagenes*

50 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido pVSSSP1 construido y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S descrito con anterioridad que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol. Después, las células de *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionadas que contenían pVSSSP1 se cultivaron en un medio de cultivo MMTG, descrito con anterioridad, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol a 30°C durante 70 horas. 10 ml del sobrenadante del cultivo se separaron por centrifugación al sobrenadante del medio de cultivo y las células. 55 Las células se suspendieron en un tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0). La actividad de svPEP se determinó de la siguiente manera: se añadieron 50  $\mu$ l del sobrenadante del medio de cultivo o de la suspensión celular a un tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) que contenía Ala-Ala-Pro-pNA (Bachem Co. Ltd.) 0,25 mM para dar una cantidad total de 0,06 ml, que se mantuvo a 30°C durante 20 minutos. Después, la reacción se detuvo tras la adición de 0,4 ml de ácido acético al 50%. Se midió la absorbancia a 410 nm y se midió la cantidad de p-NA (p-nitroanilida) liberada para determinar la actividad. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de pNA por minuto. Como resultado, la actividad de svPEP no se detectó en el sobrenadante del medio de cultivo, pero se detectó en la suspensión celular. Realizando cálculos a partir de los valores de actividad detectada y de los valores de la actividad específica (35,5 u/mg) descritos en el Ejemplo 7 (1), se confirmó la expresión y secreción en la superficie de la célula de tanto como aproximadamente 50 mg/l de svPEP. 65

## ES 2 335 750 T3

(5) *Ruptura de la parte de pro-estructura de la transglutaminasa que tiene la pro-estructura por la serina proteasa y la proteasa específica de prolina expresada y secretada por C. glutamicum ATCC13869*

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 que alberga el plásmido de expresión secretora pPKSPTG1 para la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura descrita en el Ejemplo 4(2), con el plásmido pVSSSP1 construido, y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S mencionado con anterioridad que comprendía 5 mg/l de cloranficol y 25 mg/l de kanamicina. Después, la *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionada que alberga pPKSPTG1 se cultivó en un medio de cultivo MMTG, descrito con anterioridad, que comprendía 5 mg/l de cloranficol y 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 70 horas. Una vez finalizado el cultivo, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y después se realizó una transferencia Western, de acuerdo con el método convencional, utilizando anticuerpos anti-transglutaminasa previamente descritos. Como resultado, se confirmó que SAMP45 y svPEP se expresaban y secretaban con normalidad, y que la parte de pro-estructura se escindió de la transglutaminasa que tiene la parte de pro-estructura que también se había secretado, confirmándose así que la secreción de la transglutaminasa que tiene un peso molecular similar al de la transglutaminasa madura natural.

La actividad de la transglutaminasa se ensayó en el sobrenadante por el método de hidroxamato descrito con anterioridad, lo que confirmó que contenía una actividad específica similar (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa natural.

Además, se transfirió en condiciones semi-secas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), después de la SDS-PAGE, de acuerdo con el método previamente descrito. Después de la transferencia, la membrana de difluoruro de polivinilideno se tiñó con Azul Brillante de Coomassie, se lavó el colorante y se secó al aire. La porción que contenía la transglutaminasa madura se recortó y analizó para determinar la secuencia de aminoácidos N-terminal utilizando un secuenciador de proteínas. Como resultado, se confirmó que tenía la misma secuencia N-terminal que la transglutaminasa natural obtenida a partir de *S. mobaraense* comenzando con Asp ubicado en la posición 77, que se muestra en SEQ ID No: 6.

### Ejemplo 8

*Producción secretora del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) utilizando el gen de fusión que contiene la secuencia que codifica la secuencia señal de la proteína de superficie celular de Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872 y la secuencia que codifica el factor de crecimiento epidérmico humano*

(1) *Construcción del gen del hEGF que contiene la secuencia señal de la proteína de superficie celular de Corynebacterium glutamicum ATCC13869*

La secuencia del gen de la proteína PS2 de superficie celular de *Corynebacterium glutamicum* ya ha sido determinada [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]. Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 46 y SEQ ID No: 47 se sintetizaron con referencia a esta secuencia. La región del gen que comprende la región del lado 5' y la región que codifica los 44 residuos de aminoácidos N-terminales correspondientes a PS2, se amplificó utilizando el método de PCR a partir del ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 que se había preparado de acuerdo con el método de Saito & Miura [Biochim., Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]. El cebador que se muestra como SEQ ID No: 46 contenía el sitio KpnI en su extremo 5' terminal que se requirió para insertar la región en un plásmido.

(SEQ ID No: 46) 5'-GCTCGGTACCCAAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID No: 47) 5'-GTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

*Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 46 y 47: cebador PCR

Por otra parte, se sintetizaron los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 48 y No: 49. La región que codifica el hEGF se amplificó por el método de PCR a partir del plásmido pT13SΔhIL2-KS-hEGF(H3) (JP Kokai No: 64-2583) que contiene la secuencia del gen para hEGF. *Escherichia coli* AJ12354 transformada con el plásmido pT13SΔhIL2-KS-hEGF(H3) que contiene el gen, fue originalmente depositada en la Agencia Administrativa Independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón) el 20 de noviembre de 1987 y ha sido transferida al depósito internacional según el Tratado de Budapest el 18 de marzo de 2002, y le ha sido asignado el número de depósito de FERM BP-7966.

El cebador que se muestra como SEQ ID No: 48 contiene la secuencia que codifica los aminoácidos C-terminales de la secuencia señal de PS2, para construir el gen de fusión con la región que comprende la región del lado 5' y que también comprende la región que codifica 44 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína correspondiente a PS2.

(SEQ ID No: 48) 5'-AACATCAACAACGGCTTCAACAATTCCGATTCTGAGTGCCCT-3'

(SEQ ID No: 49) 5'-CGGCCACGATGCGTCCGGCG-3'

## ES 2 335 750 T3

### Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID No: 48 y 49: cebador de PCR

5 Después, el gen de fusión, en el que hGEF se ligó a la región que comprende la región del lado 5' y la región que codifica 44 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular de *Corynebacterium glutamicum*, se amplificó realizando una PCR cruzada con SEQ ID No: 46 y SEQ ID No: 49 utilizando como molde la mezcla que contenía 1 µl de la solución de reacción de PCR con la región que comprende la región del lado 5' y la región que codifica 44 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular de *Corynebacterium glutamicum* y 1 µl de la solución de reacción de PCR que contiene la región del gen del hEGF amplificado. El fragmento de aproximadamente 0,9 kb se detectó por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento se recuperó del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.). El ADN recuperado fue escindido por KpnI y BamHI (Takarashuzo Co. Ltd.), se purificó por el sistema DNA Clean-UP (Promega), y se insertó en el sitio KpnI-BamHI del plásmido pPK4 descrito en JP-Kokai Núm. 9-322774 para obtener pPKEGF. La secuencia nucleotídica del fragmento insertado se determinó utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems) y el Secuenciador de ADN 373A (PE Applied Biosystems), para confirmar la construcción del gen de fusión esperado.

### (2) Construcción del gen del hEGF que contiene la secuencia señal de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872

20 Los cebadores que se muestran en SEQ ID No: 24 y SEQ ID No: 50 se sintetizaron con referencia a la secuencia del gen de la proteína de superficie celular (SIpA) [JP-Kokai Núm. 10-108675] de *C. ammoniagenes* y la región que comprende la región del lado 5' que contiene la región promotora del gen de la proteína de superficie celular (SIpA) y la región que codifica sus 25 residuos de aminoácidos N-terminales se amplificó utilizando el método de PCR a partir del ADN cromosómico de *C. ammoniagenes* preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8(1). El cebador que se muestra en SEQ ID No: 50 también contenía la secuencia que codifica los aminoácidos N-terminales del hEGF, para construir el gen de fusión fusionado con hEGF.

(SEQ ID No: 24) 5'-GCCCAGAAGCCCAAATTGAGATTT-3'

(SEQ ID No: 50) 5'-AGGGCACTCAGAATCGGAATTTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCC-3'

### Texto libre de listado de secuencias

35 SEQ ID No: 24 y 50: cebadores de PCR

Se sintetizaron los cebadores indicados en SEQ ID No: 51 y SEQ ID No: 49 y la región que codifica el hEGF se amplificó a partir del plásmido pT13SΔhIL2-KS-hEGF(H3) (JP Kokai No: 64-2583) que contiene la secuencia del gen del hEGF.

(SEQ ID No: 49) 5'-CGGCCACGATGCGTCCGGCG-3'

(SEQ ID No: 51) 5'-AATTCCGATTCTGAGTGCCCT-3'

### Texto libre de listado de secuencias

50 SEQ ID No: 49 y 51: cebadores de PCR

El gen de fusión, en el que el gen del hEGF se ligó a la región del lado 5' y a la región que codifica 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes*, se amplificó realizando una PCR cruzada con SEQ ID No: 49 y SEQ ID No: 24 utilizando como moldes la mezcla que contenía 1 µl de la solución de PCR de la región del lado 5' amplificada y la región que codifica 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *C. ammoniagenes* y 1 µl de la solución de PCR para la región del gen del hEGF.

Además, se sintetizaron los cebadores indicados en SEQ ID No: 52 y SEQ ID No: 53, y la región del lado 5' de la proteína correspondiente a PS2 se amplificó por el método de PCR utilizando el plásmido pKEGF obtenido en el Ejemplo 8(1) como molde. El cebador que se muestra en SEQ ID No: 53 también contenía la secuencia del extremo 3'-terminal de la región del lado 5' de la proteína correspondiente a PS2 y la región que codifica los aminoácidos N-terminales de la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *Corynebacterium ammoniagenes*.

(SEQ ID No: 52) 5'-GAATTCGAGCTCGGTACCCA-3'

(SEQ ID No: 53) 5'-AGCGATTCATGCGTTTCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAA-3'

## ES 2 335 750 T3

### *Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 52 y 53: cebadores de PCR

5 Por otra parte, la región del gen del hEGF que contiene la secuencia señal de la proteína de superficie celular (SIpA) de *Corynebacterium ammoniagenes* se amplificó utilizando los cebadores indicados en SEQ ID No: 54 y SEQ ID No:49 preparados tomando como base el gen de fusión del hEGF, que comprende la secuencia señal y la región del lado 5' de la proteína de superficie celular (SIpA) de *Corynebacterium ammoniagenes*. Para la PCR, se utilizó ADN polimerasa Pyrobest (Takarashuzo Co. Ltd.) y las condiciones de reacción siguieron el protocolo de las instrucciones.

(SEQ ID No: 49) 5'-CGGCCACGATGCGTCCGGCG-3'

(SEQ ID No: 54) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGC-3'

15

### *Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 49 y 54: cebadores de PCR

20

Después, el gen de fusión del hGEF, que se ligó a la región que codifica los 25 residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína de superficie celular (SIpA) de *Corynebacterium ammoniagenes* y a la región del lado 5' que codifica la proteína correspondiente a PS2 de *Corynebacterium glutamicum*, se amplificó realizando una PCR cruzada con SEQ ID No: 52 y SEQ ID No: 49 utilizando la mezcla que contenía 1 µl de la solución de PCR de la región del lado 5' amplificada para la proteína correspondiente a PS2 de *Corynebacterium glutamicum* y 1 µl de la solución de PCR de la proteína de superficie celular (SIpA) de *Corynebacterium ammoniagenes*. Para la PCR, se utilizó ADN polimerasa Pyrobest (Takarashuzo Co. Ltd.) y las condiciones de reacción siguieron el protocolo de las instrucciones. El fragmento amplificado de aproximadamente 0,9 kb se detectó por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Versión 2 (Takarashuzo Co. Ltd.), se digirió con KpnI y BamHI (Takarashuzo Co. Ltd.) y se purificó por el sistema DNA Clean-UP (Promega). El fragmento se insertó en el sitio KpnI-BamHI del plásmido pPK4 descrito en JP-Kokai Núm. 9-322774 para obtener pPSEGF. La secuencia nucleotídica del fragmento insertado se determinó utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems) y el Secuenciador de ADN 373A (PE Applied Biosystems), para confirmar la construcción del gen de fusión esperado.

35

### *(3) Generación de cepas productoras de hEGF*

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido de expresión de hEGF pPSEGF construido en (2) por el método de electroporación para obtener cepas resistentes a la kanamicina. Las cepas obtenidas se cultivaron con agitación a 30°C durante 3 días con medio líquido MMTG (60 g de glucosa, 0,4 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 30 g de sulfato de amonio, 1 g de dihidrógeno fosfato de potasio, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidrato, 0,01 g de sulfato de manganeso (II) pentahidrato, 450 µg de hidrocloreuro de tiamina, 450 µg de biotina, 0,15 g de DL-metionina, 50 g de carbonato de calcio por litro de agua destilada, ajustado a pH 7,5) que contenía 5 mg/ml de kanamicina. Las células se eliminaron por centrifugación y 10 µl del sobrenadante del cultivo se sometieron a SDS-PAGE. El hEGF comercialmente disponible (PEPRO TECHEC LTD) se sometió simultáneamente a electroforesis como estándar, y se llevó a cabo la tinción con Azul Brillante Coomassie (CBB). Los resultados mostraron que la banda se detectó en la posición correspondiente a la misma movilidad que el estándar. Se observaron otras pocas proteínas impuras en el sobrenadante del cultivo.

50

### *(4) Determinación de la cantidad de hEGF producida por la cepa productora de hEGF que alberga el plásmido pPSEGF*

El sobrenadante del cultivo de la cepa productora de hEGF se analizó con una columna de HPLC (YMC-AP203Ca300A.C18, tamaño de partículas 5 µm, 4,6 mm de diámetro x 250 mm de longitud), utilizando como tampones TFA 0,1%/acetonitrilo 24%, TFA 0,1%/acetonitrilo 44%, un gradiente lineal de 1%/min., caudal de flujo de 1,0 ml/min., y detección a 280 nm. La cuantificación se llevó a cabo comparando el área del pico con el área observada cuando se analizó el hEGF estándar, lo que reveló un valor de aproximadamente 100 mg/l.

60

### *(5) Determinación de la actividad biológica del hEGF secretado por la cepas productora de hEGF que alberga el plásmido pPSEGF*

Se determinó la actividad del EGF en el cultivo del sobrenadante de la cepa productora de hEGF. Se colocaron células MCF-7 (A.V. Krishman, Journal of Bone and research, 6, 1099-1107, 1991) en una placa de 96 pocillos a una densidad celular inicial de  $1 \times 10^4$  por pocillo y se añadió a los pocillos la dilución seriada a la mitad del

65

## ES 2 335 750 T3

sobrenadante del cultivo de la cepa productora de EGF. La captación de timidina se determinó después de 72 horas. La actividad fue de  $1,4 \times 10^9$  U/ml, según lo calculado por comparación con el valor del hEGF estándar, de  $10^7$  U/mg.

5

(6) *Análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminales del hEGF secretado por la cepa productora de EGF que alberga el plásmido pPSEGF*

10 120  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo de la cepa productora de EGF se aplicaron a la columna de HPLC, y se aislaron utilizando las condiciones descritas para la cuantificación por HPLC. Se recolectó el pico correspondiente a la posición de elución del hEGF estándar. La determinación se llevó a cabo utilizando el secuenciador de aminoácidos PPSQ-10 (Shimadzu Co.) en fase gaseosa. Los resultados fueron: Asn para el primer residuo; Ser para el segundo residuo; Asp para el tercer residuo; Ser para el cuarto residuo, respectivamente, desde el extremo N-terminal. Los resultados correspondieron a la secuencia de aminoácidos N-terminales del hEGF indicadas en SEQ ID No: 55.

15

(7) *Determinación del peso molecular del hEGF secretado por la cepa productora de EGF que alberga el plásmido pPSEGF*

20 120  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo de la cepa productora de hEGF se aplicaron a la columna de HPLC, y se aislaron utilizando las condiciones descritas en (4).

25 Se recolectó el pico de hEGF eluido. La muestra se aplicó nuevamente a la misma HPLC para fraccionamiento, lo que confirmó que la muestra exhibió un pico en HPLC. La muestra se sometió a espectroscopía de masas. La determinación se llevó a cabo utilizando un MALDI-TOFMS (espectrómetro de masas con desionización láser asistida por matrices - tiempo de vuelo) MALDI IV (Shimadzu Co.). El promedio de las dos mediciones fue de 6176. El resultado se encontraba dentro del límite de error del valor teórico de 6217, que se había calculado para el peso molecular del hEGF, suponiendo que existieran tres enlaces S-S en la molécula. Así, se confirmó que el hEGF producido por la cepa productora de EGF preparada por el método descrito, tiene la secuencia de aminoácidos y la estructura esperada.

30

### Ejemplo 9

35 *Construcción de Corynebacterium glutamicum AJ12036 mejorada en la secreción de proteínas heterólogas, construcción de la cepa de interrupción del gen de la proteína de superficie celular (PS2) obtenida a partir de AJ12036, y la estimación de la producción de proteína heteróloga utilizando estas cepas mutantes*

40 (1) *Producción de la cepa de interrupción del gen de la proteína de superficie celular (PS2) obtenida a partir de Corynebacterium glutamicum AJ12036*

45 La cepa AJ12036 resistente a la Estreptomycin (Sm) se había desarrollado a partir de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 y AJ12036 se ha utilizado como hospedante para la recombinación genética con *Corynebacterium glutamicum* (Patente de los Estados Unidos No. 4.822.738). Se depositó *Corynebacterium glutamicum* (antes, *Brevibacterium lactofermentum*) AJ12036 en el Instituto Nacional de Tecnología Microbiana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (Actualmente, Agencia Administrativa Independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón) el 26 de marzo de 1984, como FERM BP-734.

50 Dado que se reveló que la cepa AJ12036 secretaba ligeramente la proteína de superficie celular (PS2) al medio de cultivo, se supuso que la eficiencia de secreción de las proteínas podía mejorarse aún más llevando a cabo la interrupción del gen para que se torne completamente deficiente en la producción de PS2. Por lo tanto, se construyó la cepa completamente deficiente en el gen de PS2 utilizando recombinación homóloga de acuerdo con lo descrito a continuación.

55

60 Los cebadores descritos a continuación se sintetizaron con referencia al ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con el método de Saito & Miura [Biochim. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)] y se llevó a cabo una PCR con la combinación de SEQ ID No: 56 y 57, y SEQ ID No: 58 y 59. La secuencia del gen de PS de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 se describió en la Patente de los Estados Unidos No. 5.547.864, y una parte de la región codificadora y su secuencia génica del lado 5' se describieron en SEQ ID No: 4.

65 Se realizó la PCR cruzada con cada fragmento amplificado y la combinación de los cebadores de SEQ ID No: 56 y No: 59, para amplificar el fragmento  $\Delta$ PS2 en el que la región promotora y la región del extremo N-terminal de la región codificadora del gen de PS2 se suprimieron del gen de PS2. Este fragmento se clonó en el sitio SmaI de pUC19 para construir pU $\Delta$ PS2. pU $\Delta$ PS2 se digirió con KpnI y XbaI para escindir el fragmento  $\Delta$ PS2 y se construyó pHS $\Delta$ PS2 insertando el fragmento en el sitio KpnI-XbaI de pHS4 (Patente de los Estados Unidos No. 5.616.489), que es un vector plásmido sensible a la temperatura obtenido a partir de pHM1519. La *Escherichia coli* AJ12570 trans-

## ES 2 335 750 T3

formada con el plásmido pHS4 se depositó en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Ministerio de Comercio Internacional e Industria (Actualmente, Agencia Administrativa Independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japón) el 11 de octubre de 1990 como FERM BP-3523.

- 5 (SEQ ID No: 56) 5'-act ggg agg cta tct cca tt-3'  
 (SEQ ID No: 57) 5'-atc gat ctg atc acg tta ca-3'  
 10 (SEQ ID No: 58) 5'-tgt aac gtg at caga tcg att cac tgg tcg aca ccg ttg a-3'  
 (SEQ ID No: 59) 5'-acg gaa gct acc ttc gag gt-3'

15 *Texto libre de listado de secuencias*

SEQ ID No: 56 a SEQ ID No: 59: cebadores de PCR

20 pHSΔPS2 se introdujo en AJ12036 por electroporación, y la cepa completamente deficiente en el gen de PS2 se obtuvo por la recombinación homóloga descrita en la Patente Japonesa No. 2.763.054. Esta cepa se designó cepa YDK010.

25 (2) *Estimación de la producción secretora de las proteínas heterólogas utilizando *Corynebacterium glutamicum* AJ12036 y la cepa para la interrupción del gen de la proteína de superficie celular (PS2) obtenida a partir de AJ12036*

30 El plásmido de expresión de la protransglutaminasa pPKSPTG1, que se describió en el Ejemplo 4 (2), se introdujo en las cepas AJ12036 y YDK010 para obtener los transformantes. Estos transformantes y la cepa de control obtenida por introducción de pPKSPTG1 en la *Corynebacterium glutamicum* ATCC14869 de tipo salvaje se utilizaron para estimar la cantidad de producción secretora.

35 Similarmente, se estimó la cantidad de producción secretora para el plásmido pVSS1 de expresión secretora de SAMP45, para el plásmido pVSSP1 de expresión secretora de svPEP y para el plásmido pPSEGF de expresión secretora del hEGF, después de obtener los transformantes de la cepa AJ12036 y de la cepa YDK010, respectivamente.

40 Las cepas cultivadas durante toda la noche en el medio de agar CM2S que comprendía 25 μg/l de kanamicina a 30°C, se inocularon en grandes tubos que contenían 4 ml de medio MMTG (Glucosa 60 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/l, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1 g/l, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g/l, VB1 · HCl 450 μg/l, Biotina 450 μg/l, DL-Met 0,15 g/l, pH 7,5) suplementado con CaCO<sub>3</sub> 5% y 25 μg/ml de kanamicina, durante 3 días a 30°C.

TABLA 3

45 *Cantidad de protransglutaminasa producida extracelularmente por las cepas mutantes*

Cepa Productora	Protransglutaminasa
ATCC13869/pPKSPTG1	235 mg/l
AJ12036/pPKSPTG1	680
YDK010/pPKSPTG1	700

55

TABLA 4

60 *Cantidad de SAMP45 producida extracelularmente por las cepas mutantes*

Cepa Productora	SAMP45
ATCC13869/pVSS1	9 mg/l
AJ12036/pVSS1	20
YDK010/pVSS1	22

65

## ES 2 335 750 T3

TABLA 5

*Cantidad de svPEP producida extracelularmente por las cepas mutantes*

Cepa Productora	svPEP
ATCC13869/pVSSSP1	50 mg/l
AJ12036/pVSSSP1	130
YDK010/pVSSSP1	150

TABLA 6

*Cantidad de hEGF producida extracelularmente por las cepas mutantes*

Cepa Productora	hEGF
ATCC13869/pPSEGF	100 mg/l
AJ12036/pPSEGF	280
YDK010/pPSEGF	290

Como puede observarse en las Tablas 3 a 6, se produjo un notorio aumento de la producción de SAMP45, svPEP y hEGF al cambiar el huésped de tipo salvaje por la cepa AJ12036 resistente a la estreptomicina. Sin embargo, sólo se observó una ligere mejora en la cantidad de producción secretora por supresión total del gen de la proteína de superficie celular (PS2) de la cepa AJ12036. El efecto negativo causado por la inhibición competitiva de la secreción de PS2 sobre la secreción de la protransglutaminasa o hEGF no se observó significativamente en estos casos. Sin embargo, no se observó secreción de PS2 en absoluto en la cepa completamente deficiente en el gen de PS2, lo que contribuyó a la reducción de las proteínas contaminadas no deseadas en el medio de cultivo. Esto es meritorio durante la purificación de la protransglutaminasa o hEGF.

### Ejemplo 10

#### *Factores efectivos en el cultivo sobre la secreción de la protransglutaminasa*

El transformante obtenido por transformación de la cepa YDK010 de *Corynebacterium glutamicum* con el pPKSPTG1 descrito con anterioridad se utilizó para estimar las condiciones de cultivo para la producción secretora de protransglutaminasa.

Las cepa cultivada durante la noche en el medio de agar CM2S que comprendía 25 µg/l de kanamicina a 30°C, se inoculó en un matraz Sakaguchi de 500 ml que contenía 20 ml de medio líquido CM2S y se cultivó hasta el día siguiente a 30°C. Esto se utilizó para cultivo de semillas.

Los efectos de la adición de CaCl<sub>2</sub> se estimaron en un recipiente tipo S que contenía medio líquido MMTG (Glucosa 60 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/l, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1 g/l, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g/l, VB1 · HCl 450 µg/l, Biotina 450 µg/l, DL-Met 0,15 g/l, pH 7,5) como medio basal suplementado con 25 µg/ml de kanamicina. Se colocaron 300 ml de medio en el matraz. La cantidad de siembra fue del 5% (15 ml) y la concentración de oxígeno disuelto se controló en 3% o menor. El cultivo se llevó a cabo a 30°C durante 3 días.

Después del cultivo, 10 µl del sobrenadante del cultivo se sometieron a SDS-PAGE y se realizó una transferencia Western, de acuerdo con el método convencional, utilizando los anticuerpos anti-transglutaminasa descritos con anterioridad. Los resultados mostraron el efecto de la adición de calcio, observándose un aumento en la cantidad de secreción de aproximadamente 1,3 a 2 veces en grupos a los que se añadió calcio, en comparación con los grupos a los que no se añadió.

TABLA 7

*Efecto del ion calcio sobre la producción secretora de protransglutaminasa*

CaCl <sub>2</sub> (g/l)	Acumulación de protransglutaminasa (mg/l)	Relación relativa
0	460	1
0,25	610	1,3
0,5	790	1,7
1,0	810	1,8
2,0	930	2,0

## ES 2 335 750 T3

Las condiciones para la aeración y agitación también se estudiaron utilizando el medio MMTG que contenía 0,2 g/l de CaCl<sub>2</sub>, lo que reveló que los mejores resultados se obtuvieron controlando la concentración de oxígeno disuelto en 3%, que es el límite de medición, o menor (Tabla 8).

5

TABLA 8

*Efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre la producción secretora de protransglutaminasa*

10

Concentración de oxígeno disuelto	Acumulación de protransglutaminasa (mg/l)	Relación relativa
Menor que 3%	930	1,43
Controlando en 3%	810	1,25
Controlando en 5%	650	1

15

20

De acuerdo con la presente invención, pueden producirse proteínas útiles, por ejemplo proteínas heterólogas tales como transglutaminasa o factor de crecimiento epidérmico humano, en gran cantidad y pueden ser secretadas extracelularmente en forma eficiente (producción por secreción) por bacterias corineformes. Las proteínas producidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se secretan al medio de cultivo, lo que hace posible recuperar con facilidad la proteína de los medios de cultivo, a gran escala, utilizando métodos apropiados conocidos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para producir una proteína heteróloga, que comprende cultivar *Corynebacterium glutamicum*  
AJ12036 (FERM BP-734) o una mutante que puede obtenerse a partir de AJ12036 (FERM BP-734), que tiene la  
capacidad de secretar la proteína heteróloga en al menos el doble de la cantidad secretada por la *Corynebacterium*  
*glutamicum* ATCC13869 de tipo salvaje, que tiene una construcción de expresión genética en la que una secuencia  
de ácido nucleico que codifica una región del péptido señal, que funciona en una bacteria corineforme y que puede  
10 obtenerse a partir de una bacteria corineforme, está conectada al lado 3' de una secuencia promotora que funciona  
en una bacteria corineforme y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga está conectada  
al lado 3' de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicha región del péptido señal, permitiendo que dicha  
bacteria corineforme produzca dicha proteína heteróloga, y recuperar dicha proteína heteróloga producida.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la bacteria corineforme mutante es una cepa mutante que no produce  
una proteína PS2 de superficie celular.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el péptido señal es un péptido señal de una  
proteína de superficie celular de una bacteria corineforme.

20 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido señal es un péptido señal de una proteína de la superficie  
celular de *Corynebacterium glutamicum*.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el péptido señal tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1  
o SEQ ID No. 2.

25 6. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido señal es un péptido señal de una proteína de superficie  
celular obtenida de *Corynebacterium ammoniagenes*.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el péptido señal tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 3.

30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cultivo de la bacteria corineforme mutante  
se realiza en un medio que contiene 2,25 mM o más de ion calcio.

35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cultivo de la bacteria corineforme mutante  
se realiza controlando la concentración de oxígeno disuelto en 3% o menor.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 335 750 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

5 <120> Método de secreción y de producción de proteínas

<130> Y1J0182

10 <140>

<141>

<150> JP 2001-98808

15 <151> 2001-03-30

<160> 60

20 <170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

25 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

30 Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys Ala Gln Ala Lys

1 5 10 15

35

Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala

20 25 30

40

Leu Thr Met Ser Leu Ala Pro Met Ala Ser Ala

35 40

45

<210> 2

50 <211> 30

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

55 <400> 2

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1 5 10 15

60

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala

20 25 30

65

ES 2 335 750 T3

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 3

10 Met Lys Arg Met Lys Ser Leu Ala Ala Ala Leu Thr Val Ala Gly Ala  
1 5 10 15

15 Met Leu Ala Ala Pro Val Ala Thr Ala  
20 25

20 <210> 4

<211> 782

<212> ADN

25 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

30 <222> (579)..(782)

<400> 4

35 aaattctgt gaattagctg atttagtact tttcggaggt gtctattctt accaaatcgt 60

caagttgtgg gtagagtcac ctgaatatta attgcaccgc acgggtgata tatgettatt 120

40 tgctcaagta gttcagagtt aagtgtatit taggtgaaca aatttcagct tcgggtagaa 180

45 gactttcgat gcgcttcaga gcttctattg ggaaatctga caccacttga ttaaatagcc 240

50 tacccecgaa ttgggggatt ggtcattttt tgctgtgaag gtagttttga tgcataatgac 300

ctgcgtttat aaagaaatgt aaacgtgatc agatcgatat aaaagaaaca gttgtactc 360

55 aggtttgaag cttttctcc gattgcctg gcaaaaatct caattgtcgc ttacagtttt 420

60 tctcaacgac aggctgctaa gctgctagtt cgggtgccta gtgagtggcg tttacttga 480

65 taaaagtaat cccatgtcgt gatcagccat tttgggttgt ttccatagca atccaaaggt 540

ES 2 335 750 T3

ttcgtctttc gataacctatt caaggagcct tcgcctct atg ttt aac aac cgt atc 596

Met Phe Asn Asn Arg Ile

5 1 5

cgc act gca gct ctc gct ggt gca atc gca atc tcc acc gca gct tcc 644

10 Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser

10 15 20

15 ggc gta gct atc cca gca ttc gct cag gag acc aac cca acc ttc aac 692

Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe Asn

25 30 35

20

atc aac aac ggc ttc aac gat gct gat gga tcc acc atc cag cca gtt 740

Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr Ile Gln Pro Val

25 40 45 50

gag cca gtt aac cac acc gag gaa acc ctc cgc gac ctg act 782

30 Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu Arg Asp Leu Thr

55 60 65

35 <210> 5

<211> 68

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

40

<400> 5

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

45 1 5 10 15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu

50 20 25 30

Thr Asn Pro Thr Phe Asn Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly

55 35 40 45

Ser Thr Ile Gln Pro Val Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu

60 50 55 60

65 <210> 6

<211> 1809

<212> ADN

# ES 2 335 750 T3

<213> *Streptovercillium mobaraense*

<220>

<221> CDS

5 <222> (578)..(1798)

<400> 6

10 gtcgacgcgg gccgggaggg ggtgcggcgg cgccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60

15 gtcggagggg cggccggata tcgtccttgg ggccgggtgg ccggaattgc cgccatggtg 120

ttgccgggga atcgaccga agacatgac acttctcgtta tccaccgat cacgtatccg 180

20 ggagtcgaga agtgttacg cgtgccctg tcccgctct caccctgtc gccgtgacag 240

25 cgaccgcgt tcttccactc gcaeggacgg cccacagga ctttcggcc cgggtcgcg 300

ccgccgcctc ggtgacgccc tccgaataac gcggccgccc ggccctcggc cggttgaccg 360

30 atccgggtca cgcgccccg cgggcgggcg gccacgtccg gtctcgccc gcccgacatc 420

35 ggtcgcgact gccttcgctc gcacttcttc ccgctcccg gccgcgtttt tccgccgccc 480

aagggtcggc gacgcgtacc gaatccccct tcatcgcgac gtgcttccgc acggccgcgt 540

40 tcaacgaigt tccacgacaa aggagttgca gttttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595

Met Arg Ile Arg Arg Arg

1

5

45 gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gcg gtg tta tgc acc gcc gga ttc 643

50 Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe

10

15

20

55 atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gcc gcc gac aat ggc gcg ggg gaa gag 691

Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu

25

30

35

60

acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gcg gat gac gtc gcg 739

65 Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala

# ES 2 335 750 T3

	40	45	50	
5	aac atc aac gcg ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc			787
	Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly			
10	55	60	65	70
15	ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac gac agg gtc acc cct ccc gcc			835
	Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala			
	75	80	85	
20	gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg			883
	Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg			
	90	95	100	
25	gcc gag acg gtc gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac			931
	Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr			
30	105	110	115	
35	agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag			979
	Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu			
	120	125	130	
40	tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag			1027
	Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln			
45	135	140	145	150
50	tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gcg tcc ttc gac gag gac agg ttc			1075
	Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe			
	155	160	165	

55

60

65

ES 2 335 750 T3

5 aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg ggc 1123  
 Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala  
 170 175 180

10 gag ttc gag ggc cgc gtc gcg aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc 1171  
 Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly  
 15 185 190 195

20 ttc cag cgg ggc cgt gag gtg gcg tcc gtc atg aac agg gcc ctg gag 1219  
 Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu  
 200 205 210

25 aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg 1267  
 Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu  
 30 215 220 225 230

35 gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc cgg ttc 1315  
 Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe  
 235 240 245

40 tac tcg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc 1363  
 Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly  
 45 250 255 260

50 aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac tcg aag cac ttc 1411  
 Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe  
 55 265 270 275

ES 2 335 750 T3

5           tgg agc ggc cag gac cgg tgg agt tgg gcc gac aag agg aag tac ggc 1459  
           Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly  
           280                           285                           290

10           gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg 1507  
           Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met  
           295                           300                           305                           310

15           tcg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc agc ccc ggt gag gga 1555  
           Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly  
                                   315                           320                           325

25           ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac 1603  
           Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp  
                                   330                           335                           340

30           gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat 1651  
           Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn  
                                   345                           350                           355

35           ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg 1699  
           Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp  
           360                           365                           370

40           tcc gag ggt tac tgg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc 1747  
           Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe  
           375                           380                           385                           390

45           atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg 1795

50  
 55  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp

395 400 405

5

cgc tgatgtgagc g

1809

10

Pro

<210> 7

15 <211> 407

<212> PRT

<213> *Streptovercillium mobaraense*

20 <400> 7

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val

25

1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp

30

20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

35

35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

40

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp

45

65 70 75 80

50

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr

55

60

65

# ES 2 335 750 T3

	85	90	95
5	Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg		
	100	105	110
10	Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met		
	115	120	125
15	Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr		
	130	135	140
20	Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser		
	145	150	155
25	Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg		
	165	170	175
30	Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser		
	180	185	190
35	Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val		
	195	200	205
40	Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp		
	210	215	220
45	Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu		
	225	230	235
50			
55			
60			
65			

ES 2 335 750 T3

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe  
 245 250 255  
 5  
 Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val  
 260 265 270  
 10  
 Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala  
 275 280 285  
 15  
 Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly  
 290 295 300  
 20  
 Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro  
 305 310 315 320  
 25  
 Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly  
 325 330 335  
 30  
 Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn  
 340 345 350  
 35  
 His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu  
 355 360 365  
 40  
 Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly  
 370 375 380  
 45  
 Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp  
 385 390 395 400  
 50  
 55  
 Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro  
 405  
 60

65 <210> 8  
 <211> 1079

ES 2 335 750 T3

<212> PRT

<213> *Streptomyces albogriseolus*

5 <400> 8

10 Asn Gly Glu Asn Ser Thr Ala Ala Gly Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ala  
1 5 10 15

15 Leu Lys Gly Lys His Arg Val Thr Leu Ile Thr Gly Asp Arg Val Ala  
20 25 30

20 Leu Asp Ala Lys Gly Arg Val Val Gly Leu Glu Pro Ala Glu Gly Arg  
35 40 45

25  
30 Glu His Ile Pro Val Gln Ile Arg Arg Ser Asp Gly His Thr Leu Val  
50 55 60

35 Val Pro Ala Asp Ala Ala Arg Leu Val Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gln  
65 70 75 80

40 Arg Leu Phe Asp Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Ala Thr Arg Thr Ala  
85 90 95

45

50

55

60

65

ES 2 335 750 T3

His Arg Gly Gly Leu Lys Val Ile Val Gly Tyr Arg Gly Ala Ala Lys  
 100 105 110  
 5  
 Ala Ala Lys Ala Asp Val Arg Asp Ala Gly Thr Val Arg Arg Thr Leu  
 115 120 125  
 10  
 Thr Ser Leu Asn Ala Asp Ala Val Gln Thr Pro Gln Glu Ala Gly Ala  
 130 135 140  
 15  
 Glu Leu Trp Glu Ala Val Thr Asp Gly Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val  
 145 150 155 160  
 20  
 Ala Arg Val Trp Leu Asp Gly Val Arg Lys Ala Ser Leu Asp Thr Ser  
 165 170 175  
 25  
 Val Gly Gln Ile Gly Thr Pro Lys Ala Trp Glu Ala Gly Tyr Asp Gly  
 180 185 190  
 30  
 Lys Gly Val Lys Ile Ala Val Leu Asp Thr Gly Val Asp Ala Thr His  
 195 200 205  
 35  
 Pro Asp Leu Lys Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Asn Phe Thr Ser Ala  
 210 215 220  
 40  
 Pro Thr Thr Gly Asp Val Val Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile  
 225 230 235 240  
 45  
 Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gln Ser Lys Gly Thr Tyr Lys Gly Val Ala  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

	245	250	255
5	Pro Gly Ala Lys Ile Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Asp Ala Gly Phe		
	260	265	270
10	Gly Asp Asp Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Glu Trp Ala Ala Ala Gln		
	275	280	285
15	Gly Ala Asp Ile Val Asn Met Ser Leu Gly Gly Met Asp Thr Pro Glu		
	290	295	300
20	Thr Asp Pro Leu Glu Ala Ala Val Asp Lys Leu Ser Ala Glu Lys Gly		
	305	310	315
25	Ile Leu Phe Ala Ile Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gln Ser Ile Gly		
	325	330	335
30	Ser Pro Gly Ser Ala Asp Ser Ala Leu Thr Val Gly Ala Val Asp Asp		
	340	345	350
35	Lys Asp Lys Leu Ala Asp Phe Ser Ser Thr Gly Pro Arg Leu Gly Asp		
	355	360	365
40	Gly Ala Val Lys Pro Asp Leu Thr Ala Pro Gly Val Asp Ile Thr Ala		
	370	375	380
45	Ala Ser Ala Lys Gly Asn Asp Ile Ala Lys Glu Val Gly Glu Lys Pro		
	385	390	395
50			400
55			
60			
65			

ES 2 335 750 T3

5 Ala Gly Tyr Met Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val  
 405 410 415

10 Ala Gly Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gln Gln His Pro Glu Trp Lys Tyr  
 420 425 430

15 Ala Glu Leu Lys Gly Ala Leu Thr Ala Ser Thr Lys Asp Gly Lys Tyr  
 435 440 445

20 Thr Pro Phe Glu Gln Gly Ser Gly Arg Val Gln Val Asp Lys Ala Ile  
 450 455 460

25 Thr Gln Thr Val Ile Ala Glu Pro Val Ser Leu Ser Phe Gly Val Gln  
 465 470 475 480

30 Gln Trp Pro His Ala Asp Asp Lys Pro Val Thr Lys Lys Leu Thr Tyr  
 485 490 495

35 Arg Asn Leu Gly Thr Glu Asp Val Thr Leu Lys Leu Thr Ser Thr Ala  
 500 505 510

40 Thr Gly Pro Lys Gly Lys Ala Ala Pro Ala Gly Phe Phe Thr Leu Gly  
 515 520 525

45 Ala Ser Thr Leu Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Ala Ser Val Asp Val  
 530 535 540

50 Thr Ala Asp Thr Arg Leu Gly Gly Ala Val Asp Gly Thr Tyr Ser Ala  
 545 550 555 560

55  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

Tyr Val Val Ala Thr Gly Ala Gly Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ala  
 5 565 570 575  
 Val Glu Arg Glu Val Glu Ser Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Leu Asp  
 10 580 585 590  
 Arg Ser Gly Lys Ala Thr Ala Asn Tyr Met Ala Tyr Leu Ser Gly Leu  
 15 595 600 605  
 Thr Gly Leu Gly Lys Asp Arg Ser Tyr Ala Pro Tyr Glu Ala Asp Gly  
 20 610 615 620  
 Ala Val Ser Val Arg Val Pro Lys Gly Gly Tyr Val Leu Asp Ala Ser  
 25 625 630 635 640  
 Val Leu Val Gly Ala Asp Pro Glu Thr Trp Arg Gly Ala Asp Trp Leu  
 30 645 650 655  
 Ala Gln Pro Lys Leu Asp Val Thr Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Asp  
 35 660 665 670  
 Ala Arg Lys Ala Lys Pro Val Lys Val Thr Val Pro Gly Lys Ala Ala  
 40 675 680 685  
 Lys Ala Gln Phe Ala Ser Ala Asp Tyr Thr Ile Glu Thr Asn Asp Ser  
 45 690 695 700  
 Ala Val Ser Tyr Gly Trp Trp Leu Glu Asn Tyr Ser Gly Phe Arg Ser  
 50 55  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

	705		710				715				720					
5	Ala	His	Leu	Gly	Pro	Gln	Ile	Thr	Asn	Gly	Thr	Leu	Ser	Gln	Gln	Trp
					725					730					735	
10	Asn	Thr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Ala	Lys	Ala	Gln	Tyr	Thr	Ala	Ile	Ser
					740					745					750	
15	Gly	Gly	Lys	Val	Lys	Lys	Leu	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr	Arg	Ala	Phe	Lys
20			755						760						765	
25	Ala	Lys	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Gln	Val	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser
			770						775						780	
30	Gly	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Ala	Phe	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser
	785					790					795					800
35	Gly	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Gln	Glu	Gln	Lys	Leu	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr
					805						810					815
40	Leu	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Trp	Asp	Leu	Asp	Phe	Glu
					820						825					830
45	Gln	Leu	Gly	Gly	Val	Asp	Asn	Glu	Gly	Trp	Pro	Ile	Tyr	Asp	Ala	Val
					835						840					845
50	Tyr	Thr	Ile	Gly	Val	Gly	Lys	Thr	Tyr	Lys	Gly	Gly	Lys	Thr	Tyr	Lys
55					850						855					860

ES 2 335 750 T3

Glu Thr Val Asn Thr Ala Val Phe Gly Pro Arg Leu Thr Ser Ser Tyr  
 865                                870                                875                                880

5

Gly Val Phe Arg Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Gly Val Ile Pro Leu Phe  
    885                                890                                895

10

Ala Asp Gly Lys Gly His Ala Gly Ser Ser Glu Phe Ser Ser Ala Val  
    900                                905                                910

15

Thr Thr Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Lys Val Gly Ser Asn Asn Asp Pro  
    915                                920                                925

20

Leu Phe Gly Glu Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Gly Asp Ala Ala Tyr  
    930                                935                                940

25

Arg Leu Thr Thr Ser Val Lys Arg Ser Ala Lys Val Ala Ala Ala Ser  
 945                                950                                955                                960

30

Thr Arg Ile Asp Ala Ser Trp Thr Phe Arg Ser Lys Lys Thr Ser Gly  
    965                                970                                975

35

Glu Lys Gln Leu Pro Val Ser Ser Ala Arg Phe Ala Ala Val Thr Gly  
    980                                985                                990

40

Leu Asp Ser Lys Val Ala Ala Gly Lys Lys Ala Thr Phe Pro Val Val  
    995                                1000                                1005

45

Val Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Val Tyr  
    1010                                1015                                1020

50

55

60

65

ES 2 335 750 T3

Val Ser Tyr Asn Gly Gly Lys Thr Trp Lys Lys Thr Thr Val Thr Lys  
1025                    1030                    1035                    1040

5

Gly Lys Ile Thr Val Lys Asn Pro Ala Lys Gly Lys Ala Ile Ser Phe  
1045                    1050                    1055

10

Arg Ala Lys Ile Thr Asp Lys Lys Gly Asn Ala Ser Leu Ile Thr Ile  
1060                    1065                    1070

15

His Asn Ala Tyr Tyr Gly Lys  
1075

20

25

<210> 9

<211> 1751

30

<212> ADN

<213> *Streptovercillium mobaraense*

<220>

35

<221> CDS

<222> (229)..(1659)

<400> 9

40

gctcctatga gcatcgacgc cgccagcagc gatcggttcg gctcgaccgt cgacgccgac 60

45

ggcgagcgcg tgtggctgga cgagcccggt cggcccgctc cgctcgtgcg gccgtgaaag 120

50

gcccgaaaag agcccaagcc gtgtgaactg cgaggacaaa ggtcttgccg caacgeatgt 180

55

60

65

ES 2 335 750 T3

5 caccacagat aagttcgccg cgacctttgc gaaccacagg gagggcgc atg cgc aag 237  
 Met Arg Lys  
 1

10 gct ctc aga tcg ctg ctg gcg gcg tcg atg ctc ata gga gcg atc ggc 285  
 Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly Ala Ile Gly  
 5 10 15

20 gcc gcc agc gcc acg gcg gag gcg gcg tcg atc acc gcc ccg cag gcc 333  
 Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala Pro Gln Ala  
 20 25 30 35

25 gac atc aag gac cgc atc ctg aag att ccc ggg atg aag ttc gtc gag 381  
 Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe Val Glu  
 30 40 45 50

35 gag aag ccc tac cag gcc tac cgc tac ctc gtg atg acg tac cgg cag 429  
 Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr Arg Gln  
 55 60 65

40 ccg gtg gac cac cgc aat ccc gcc aag ggg acc ttc gag cag cgc ttc 477  
 Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln Arg Phe  
 45 70 75 80

50 acc ctg ctc cac aag gac acc gac cgg ccg acc gtg ttc ttc acg tcc 525  
 Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Thr Ser  
 85 90 95

55

60

65

ES 2 335 750 T3

5            ggc tac aac gtc tcc acc aac ccc agc cgc agc gag ccc acg cgc atc    573  
             Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr Arg Ile  
             100                            105                            110                            115

10            gtg gac ggc aac cag gtg tgg atg gag tac cgg ttc ttc acg ccg tcc    621  
             Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr Pro Ser  
    120                            125                            130

15            cgg ccg cag ccc gcc gac tgg tcc aag ctg gac atc tgg cag gcg gcg    669  
 20            Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln Ala Ala  
    135                            140                            145

25            agt gac cag cac cgc ctg tac cag gcg ctg aag ccg gtc tac ggg aag    717  
             Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr Gly Lys  
    150                            155                            160

30            aac tgg ctg gcc acg ggc ggc agc aag ggc ggc atg acg gcc acc tac    765  
 35            Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala Thr Tyr  
    165                            170                            175

40            ttc cgc cgc ttc tac ccg aac gac atg aac ggc acg gtc gcc tac gtc    813  
             Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala Tyr Val  
 45            180                            185                            190                            195

50            gcg ccc aac gac gtg aac gac aag gaa gac tgg gcg tac gac aag ttc    861  
             Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp Lys Phe  
    200                            205                            210

55            ttc cag aac gtc ggc gac aag gcg tgc cgc acg cag etc aac tgg gtg    909

ES 2 335 750 T3

Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn Ser Val  
 215 220 225  
 5  
 cag cgc gag gcg ctc gtc cgc cgc gac gag atc gtc gcc cgc tac gag 957  
 Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg Tyr Glu  
 230 235 240  
 10  
 aag tgg gct aag gag aac ggc aag acg ttc aag gtc gtc ggc agc gcc 1005  
 Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly Ser Ala  
 245 250 255  
 20  
 gac aag gcg tac gag aac gtc gtc ctc gac ctg gtc tgg tcc ttc tgg 1053  
 Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser Phe Trp  
 260 265 270 275  
 25  
 cag tac cac ctg cag agc gac tgc gcc tcc gtc ccc gcc acc aag gcg 1101  
 Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr Lys Ala  
 280 285 290  
 35  
 tcc acc gac gag ctg tac aag ttc atc gac gac atc tcg ggc ttc gac 1149  
 Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly Phe Asp  
 295 300 305  
 40  
 ggc tac acc gac cag ggc ctg gag cgc ttc acc ccg tac tac tac cag 1197  
 Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr Tyr Gln  
 310 315 320  
 50  
 gcg ggc acc cag ctc ggc gcc cct acg gtg aag aac ccg cac ctc aag 1245  
 Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His Leu Lys  
 55  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

	325	330	335	
5	ggc gtg ctg cgg tac ccc ggc atc aac cag ccg cgc tgc tac gtc ccc			1293
	Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr Val Pro			
10	340	345	350	355
15	cgc gac atc ccg atg acc ttc cgc ccc ggc gcg atg gcg gac gtc gac			1341
	Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp Val Asp			
	360	365	370	
20	cgc tgg gtg cgc gAg gac agc cgg aac atg ctc ttc gtg tac ggg cag			1389
	Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr Gly Gln			
25	375	380	385	
30	aac gac ccg tgg agc ggt gaa ccg ttc cgc ctg ggc aag ggc gcc gcc			1437
	Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly Ala Ala			
	390	395	400	
35	gcc cgg cac gac tac cgc ttc tac gcc ccg ggc ggc aac cac ggt tcc			1485
	Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His Gly Ser			
40	405	410	415	
45	aac atc gcc cag ttg gtg gcc gac gag cgg gcc aag gcc acg gcc gag			1533
	Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr Ala Glu			
	420	425	430	435
50	gtc ctg aag tgg gcc ggt gtg gcg ccg cag gcc gtc cag aag gac gag			1581
	Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys Asp Glu			
55	440	445	450	
60				
65				

ES 2 335 750 T3

5 aag gcc gcc aag ccg ctc gcg ccg ttc gac gcc aag ctc gac cgc gtg 1629  
Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp Arg Val  
455 460 465

10 aag aac gac aag cag agc gcg ctg cgt ccg tagggacca gtgcgtaagg 1679  
Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro  
470 475

15 cggcgggcgc tcccgccgag gggcgccgc cgtcgcgttc cggaaggccc cgggtgcgc 1739

20 cgccggtgct tc 1751

25 <210> 10

<211> 477

<212> PRT

30 <213> *Streptovercillium mobaraense*

<400> 10

35 Met Arg Lys Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly  
1 5 10 15

40 Ala Ile Gly Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala  
20 25 30

45 Pro Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys  
50 35 40 45

55

60

65

ES 2 335 750 T3

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

ES 2 335 750 T3

Asp Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu  
 5           210                           215                           220

Asn Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala  
 10       225                           230                           235                           240

Arg Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val  
 15                           245                           250                           255

Gly Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp  
 20                           260                           265                           270

Ser Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala  
 25           275                           280                           285

Thr Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser  
 30       290                           295                           300

Gly Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr  
 35       305                           310                           315                           320

Tyr Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro  
 40                           325                           330                           335

His Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser  
 45                           340                           345                           350

Tyr Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala  
 50                           355

55

60

65

ES 2 335 750 T3

5                    355                    360                    365  
 Asp Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val  
                   370                    375                    380  
 10  
 Tyr Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys  
 385                    390                    395                    400  
 15  
 Gly Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn  
 20                    405                    410                    415  
 25  
 His Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala  
                   420                    425                    430  
 30  
 Thr Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln  
                   435                    440                    445  
 35  
 Lys Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu  
                   450                    455                    460  
 40  
 Asp Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro  
 45                    465                    470                    475

50 <210> 11  
     <211> 30  
     <212> ADN  
     <213> Secuencia artificial

55 <220>  
     <223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

60 <400> 11

gactccgacg acaggtcac ccctccgcc

30

65 <210> 12  
     <211> 30  
     <212> ADN

## ES 2 335 750 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 12	
10	cgctcacatc acggccagcc ctgctttacc	30
	<210> 13	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR para la región del promotor y la región de la secuencia señal de <i>S. mobaraense</i>	
	<400> 13	
25	gtgaccctgt cgtcggagtc	20
	<210> 14	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR para la región del promotor y la región de la secuencia señal de <i>S. mobaraense</i>	
40	<400> 14	
	ggcatcctgt cgagcggctc	20
45	<210> 15	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
55	<400> 15	
	aaattcctgt gaattagctg atttag	26
60	<210> 16	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	

## ES 2 335 750 T3

	<400> 16	
	gagctctccg gcgtatgcg atagaggcga aggctccttg aata	44
5	<210> 17	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
15	<400> 17	
	atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc	30
20	<210> 18	
	<211> 47	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
30	<400> 18	
	ggggtgacct tgctgctgga gtcgttgaag ccggtgttga tgttgaa	47
35	<210> 19	
	<211> 51	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
45	<400> 19	
	cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagc gaatgctggg atagcaacgc c	51
50	<210> 20	
	<211> 51	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
60	<400> 20	
	cttcgtctct tccccgcgc cattgtcctg agcgaatgct gggatagcta c	51
65	<210> 21	
	<211> 51	

## ES 2 335 750 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 21	
10	cttcgtctct tccccgcgc cattgctgtt gaagccgttg ttgatgttga a	51
	<210> 22	
15	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 22	
25	cttcgtctct tccccgcgc cattgctagt caggtcgcgg agggtttct c	51
	<210> 23	
30	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 23	
40	gacaatggcg cgggggaaga gacgaagtcc	30
	<210> 24	
45	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 24	
55	gccagaagc caaaattga gattt	25
	<210> 25	
60	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	

## ES 2 335 750 T3

	<400> 25	
	cttctgtctt tccccgcgc cattgtctgc cgttgccaca ggtgcggcca gc	52
5	<210> 26	
	<211> 52	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
15	<400> 26	
	cgcagccagc gattcatgc gttcataga ggcgaaggct ccttgaatag gt	52
20	<210> 27	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
30	<400> 27	
	atgaaacgca tgaatcgtt ggctcggcgc	30
35	<210> 28	
	<211> 25	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
45	<400> 28	
	ggatccggag cttatcgact gcacg	25
50	<210> 29	
	<211> 52	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
60	<400> 29	
	cgcagccagc gattcatgc gttcataat tctgttctct gtgtgaaatt gt	52
65	<210> 30	
	<211> 1461	

ES 2 335 750 T3

<212> ADN

<213> *Streptovercillium cinnamoneum*

5 <220>

<221> CDS

<222> (151)..(1398)

10 <400> 30

cggcggcagc cctccttgcc gccggcgag cgacgcagga cggcgcggcc aaggecctga 60

15

gcggcagctc gtcgcaaacc cctccatgctc gtcgtgctct cacatgcect cgtttcacga 120

20

ggcttcacca caaggagtt attgatttcc atg cac aaa cgt cgg aga ctt ctc 174

Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu

25

1

5

gcc ttc gcc act gtg ggt gcg gtc ata tgc acc gca gga ttc aca cct 222

Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro

10

15

20

35

tgc gtc agc cag gcc gcc agc agt gcc gat ggg gaa gag aag ggg tcc 270

Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser

25

30

35

40

45

tac gcc gaa acg cac gcc ctg acg gcg gat gac gtc gag agc atc aac 318

Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn

50

45

50

55

gca ctg aac gaa aga gct ctg act ctg gcc caa cct gcc aag cct ccg 366

Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro

60

65

70

60

65

ES 2 335 750 T3

aag gaa tta cct ccg agc gcc agc gcg ccc tcc cgg gcc ccc tcc gat 414  
 Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp  
 5                   75                   80                   85

gac cgg gaa act cct ccc gcc gag ccg ctc gac agg atg cct gag gcg 462  
 Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala  
 10                   90                   95                   100

tac cgg gcc tac gga ggc agg gcc act acg gtc gtc aac aac tac ata 510  
 Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile  
 15                   105                   110                   115                   120

cgc aag tgg cag cag gtc tac agt cac cgc gac gga aag aaa cag caa 558  
 Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln  
 20                   125                   130                   135

atg acc gaa gag cag cga gaa aag ctg tcc tac ggt tgc gtt ggc gtc 606  
 Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val  
 25                   140                   145                   150

acc tgg gtc aac tcg ggc ccc tac ccg acg aac aga ttg gcg ttc gcg 654  
 Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala  
 30                   155                   160                   165

tcc ttc gac gag aac aag tac aag aac gac ctg aag aac acc agc ccc 702  
 Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro  
 35                   170                   175                   180

ES 2 335 750 T3

5           cga ccc gat gaa acg cgg gcg gag ttc gag ggt cgc atc gcc aag ggc   750  
           Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly  
           185                   190                   195                   200

10           agt ttc gac gag ggg aag ggt ttc aag cgg gcg cgt gat gtg gcg tcc   798  
           Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser  
                           205                   210                   215

15           gtc atg aac aag gcc ctg gaa aat gcc cac gac gag ggg act tac atc   846  
           Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile  
                           220                   225                   230

25           aac aac ctc aag acg gag ctc acg aac aac aat gac gct ctg ctc cgc   894  
           Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg  
                           235                   240                   245

30           gag gac agc cgc tcg aac ttc tac tcg gcg ctg agg aac aca ccg tcc   942  
           Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser  
                           250                   255                   260

35           ttc aag gaa agg gac ggc ggc aac tac gac ccg tcc aag atg aag gcg   990  
           Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala  
           265                   270                   275                   280

40           gtg atc tac tcg aag cac ttc tgg agc ggg cag gac cag cgg ggc tcc   1038  
           Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser  
                           285                   290                   295

45           tcc gac aag agg aag tac ggc gac ccg gaa gcc ttc cgc ccc gac cag   1086

50  
 55  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln  
 5                                    300                                    305                                    310

ggt acc ggc ctg gtc gac atg tcg aag gac aga agc att ccg cgc agt 1134  
 10 Gly Thr Gly-Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser  
                                   315                                    320                                    325

ccg gcc aag ccc ggc gaa ggt tgg gtc aat ttc gac tac ggt tgg ttc 1182  
 15 Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe  
 20                                    330                                    335                                    340

ggg gct caa aca gaa gcg gat gcc gac aaa acc aca tgg acc cac ggc 1230  
 25 Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly  
                                   345                                    350                                    355                                    360

gac cac tac cac gcg ccc aat agc gac ctg ggc ccc atg cac gta cac 1278  
 30 Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His Val His  
 35                                    365                                    370                                    375

gag agc aag ttc cgg aag tgg tct gcc ggg tac gcg gac ttc gac cgc 1326  
 40 Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg  
                                   380                                    385                                    390

gga gcc tac gtg atc acg ttc ata ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc 1374  
 45 Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro  
 50                                    395                                    400                                    405

gcc aag gtg gag caa ggc tgg ccg tgacaggctg gtactacgac ctctgctgat 1428  
 55 Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro  
 60  
 65

ES 2 335 750 T3

410

415

5

ttctgcccgg tcagtccacg cctctegacg cga

1461

10 <210> 31

<211> 416

<212> PRT

15 <213> *Streptovercillium cinnamoneum*

<400> 31

20

Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val

1

5

10

15

25

Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser

20

25

30

30

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr

35

40

45

35

Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr

50

55

60

40

Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser

65

70

75

80

45

Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu

50

85

90

95

55

60

65

ES 2 335 750 T3

5 Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala  
 100 105 110

10 Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser  
 115 120 125

15 His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys  
 130 135 140

20 Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr  
 145 150 155 160

25 Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys  
 165 170 175

30 Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu  
 180 185 190

35 Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe  
 195 200 205

40 Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn  
 210 215 220

45 Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr  
 225 230 235 240

50 Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr  
 245 250 255

55  
 60  
 65

## ES 2 335 750 T3

5	Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn	260	265	270
10	Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp	275	280	285
15	Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp	290	295	300
20	Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser	305	310	315
25	Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp	325	330	335
30	Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala	340	345	350
35	Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser	355	360	365
40	Asp Leu Gly Pro Met His Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser	370	375	380
45	Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile	385	390	395
50	Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro			
55		405	410	415

<210> 32

<211> 21

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

## ES 2 335 750 T3

<400> 32	
ggcgatgggg aagagaaggg g	21
5	
<210> 33	
<211> 32	
<212> ADN	
10 <213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
15	
<400> 33	
ggcggatcct cgcgtcgaga ggcgtggact ga	32
20	
<210> 34	
<211> 21	
<212> ADN	
25 <213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
30	
<400> 34	
tacgaattcg agctcgtac c	21
35	
<210> 35	
<211> 43	
<212> ADN	
40 <213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
45	
<400> 35	
ccccctctct tcccacgc ctgccgttgc cacaggtgcg gcc	43
50	
<210> 36	
<211> 26	
<212> ADN	
55 <213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
60	
<400> 36	
aacggggaga acagcacggc cgccgg	26
65	
<210> 37	
<211> 29	

## ES 2 335 750 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

<400> 37

10

ggcgaattct ccggcgggcc gtcaccggt

29

<210> 38

15

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR para la construcción de prepro-serina proteasa fusionada

<400> 38

25

ggcaagctta aattcctgtg aattagctga

30

<210> 39

30

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR para la construcción del gen de prepro-serina proteasa fusionada

40 <400> 39

cggccgtgct gttctccccg tttgccgtgccacaggtgc ggcc

44

45 <210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> *Streptovercillium mobaraence*

50

<400> 40

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe

55

1

5

10

15

60

Val Glu Glu Lys

20

65 <210> 41

<211> 11

<212> PRT



## ES 2 335 750 T3

	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 45	
5	ggggcgggtga tcgacgccgc ctctgccgtt gccacaggtg cggcca	46
	<210> 46	
10	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 46	
20	gctcgggtacc caaattcctg tgaattagct gatttag	37
	<210> 47	
25	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 47	
35	gttgaagccg ttgtgatgt tga	24
	<210> 48	
40	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 48	
50	aacatcaaca acggettcaa caattccgat tctgagtgcc ct	42
	<210> 49	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 49	
65	cggccacgat gcgtccggcg	20

## ES 2 335 750 T3

	<210> 50	
	<211> 43	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
10	<400> 50	
	agggcactca gaatcggaat ttgccgttgc cacaggtgcg gcc	43
15	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
25	<400> 51	
	aattccgatt ctgagtgcc t	21
30	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
40	<400> 52	
	gaattcgagc tcgtaccca	20
45	<210> 53	
	<211> 40	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR	
55	<400> 53	
	agcgatttca tgcgttcat agaggcgaaggctccttgaa	40
60	<210> 54	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 335 750 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

5 <400> 54

atgaaacgca tgaatcgct ggc

23

10 <210> 55

<211> 53

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 55

20 Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His  
1 5 10 15

25 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn  
20 25 30

30 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys  
35 40 45

40 Trp Trp Glu Leu Arg  
50

<210> 56

<211> 20

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

<400> 56

55

actgggaggc tatctccatt

20

<210> 57

<211> 20

60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

## ES 2 335 750 T3

<400> 57  
atcgatctga tcacgttaca 20

5  
<210> 58  
<211> 40  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

15  
<400> 58  
tgtaacgtga tcagatcgat tcaactggctg acaccgttga 40

20  
<210> 59  
<211> 20  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de PCR

30  
<400> 59  
acggaagcta ccttcgaggt 20

35  
<210> 60  
<211> 4  
<212> PRT  
40 <213> *Streptovercillium mobaraense*

<400> 60  
45 Phe Arg Ala Pro  
1

50

55

60

65