



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 219**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00951461 .3**

(86) Fecha de presentación : **27.07.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1196603**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

(54) Título: **Mono-oxigenasas del citocromo P450, modificadas.**

(30) Prioridad: **27.07.1999 DE 199 35 115**
10.03.2000 DE 100 11 723

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

(72) Inventor/es: **Hauer, Bernhard;**
Pleiss, Juergen;
Schwaneberg, Ulrich;
Schmitt, Jutta;
Fischer, Markus;
Schmid, Rolf y
Li, Qing-shan

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Mono-oxigenasas del citocromo P450, modificadas.

5 La presente invención se refiere a mono-oxigenasas del citocromo P450, modificadas, con un perfil modificado del sustrato, a secuencias de ácidos nucleicos, a construcciones de expresión y a vectores, que las codifican, a microorganismos recombinantes, que contienen a estos vectores, así como a procedimientos para la obtención microbiológica de ácidos carboxílicos alifáticos hidroxilados de manera terminal o subterminal.

10 La mono-oxigenasa con la denominación P450 BM-3 es un enzima del citocromo P450 procedente de *Bacillus megaterium* y tiene una marcada homología secuencial con los enzimas P450 de mamíferos (1). Debido a estas coincidencias, la P450 BM-3 representa un excelente sistema modelo para esta clase de enzimas P450. La P450 BM-3 hidroxila, en primer lugar, a los ácidos grasos saturados de cadena larga en su átomo de carbono ω -1, ω -2 y ω -3. Del mismo modo, son transformadas las amidas o los análogos alcohólicos y los epóxidos de los ácidos grasos insaturados de cadena larga (1-3). La actividad catalítica para los ácidos grasos saturados depende de la longitud de la cadena, encontrándose el óptimo de las longitudes de las cadenas entre 14 y 16 átomos de carbono. El enzima no muestra actividad catalítica para los ácidos grasos con una longitud de cadena menor que 12 átomos de carbono (1).

Resumen de la invención

20 La tarea de la presente invención consistía, por lo tanto, en proporcionar mutantes de la mono-oxigenasa del citocromo P450, que mostrasen un perfil modificado del sustrato en comparación con el enzima de tipo natural. Especialmente, debían proporcionarse nuevos mutantes, que hidroxilasen a los ácidos carboxílicos alifáticos, saturados, en otra posición de la cadena y/o que tuviesen una especificidad modificada con respecto al sustrato. Ante todo, debían proporcionarse aquellos mutantes, que tuviesen actividad catalítica frente a los ácidos carboxílicos alifáticos con una longitud media de la cadena, especialmente con una longitud de la cadena comprendida entre 8 y 12, tal como por ejemplo comprendida entre 8 y 10 átomos de carbono y que los hidroxilasen de manera subterminal, ante todo, en las posiciones ω -1, ω -2 y/o ω -3.

30 Esta tarea se resolvió, sorprendentemente, mediante la preparación de mono-oxigenasas del citocromo P450, modificadas, que muestran un cuadro de reactividad, o bien un perfil con respecto al sustrato, modificado, en el caso de la hidroxilación enzimática terminal y/o subterminal de los ácidos carboxílicos alifáticos, por medio de una combinación de una evolución dirigida y de una mutagénesis localmente específica de su región de fijación con el sustrato, en comparación con el tipo natural.

35 Descripción detallada de la invención

Para los mutantes según la invención debe observarse un "perfil modificado del sustrato" en comparación con el enzima de tipo natural. Un "perfil modificado del sustrato" significa, en el ámbito de la presente invención, a) una mejora de la reactividad, tal como, por ejemplo, un aumento de la actividad específica (expresada como nmoles de ácido carboxílico transformado/minuto/nmol de enzima P450) y/o un aumento de, al menos, un parámetro cinético seleccionado entre K_{cat} , K_m y K_{cat}/K_m , por ejemplo de, al menos, un 1%, tal como por ejemplo entre un 10 y un 1.000%, entre un 10 y un 500%, o entre un 10 y un 100% de los mutantes con respecto a, al menos, un ácido carboxílico alifático, que puede ser hidroxilado o con respecto a un derivado de un ácido carboxílico alifático, que puede ser hidroxilado y/o b) una modificación, especialmente un aumento, de la regioselectividad en el caso de la hidroxilación de los ácidos carboxílicos. Esto consiste, por ejemplo, en un desplazamiento de la posición de la hidroxilación preferentemente terminal o subterminal (ω -1, ω -2, ω -3, ω -4, especialmente ω -1 hasta ω -3), al menos, en un ácido carboxílico, que puede ser hidroxilado, o en un derivado de un ácido carboxílico alifático, que puede ser hidroxilado. Los ácidos carboxílicos alifáticos, que pueden ser hidroxilados, o sus derivados, en los cuales debe observarse, según la invención, un "perfil modificado del sustrato", son los ácidos carboxílicos ramificados o, preferentemente, de cadena lineal con 8 hasta 30 átomos de carbono. En este caso, la modificación, según la invención, del perfil del sustrato puede estar claramente marcada a través de todo el intervalo de tamaño (es decir entre 8 y 30 átomos de carbono) o puede estar marcada únicamente en intervalos parciales, por ejemplo en el caso de los ácidos carboxílicos con 8 hasta 12 átomos de carbono, con 10 hasta 12 átomos de carbono, con 12 hasta 30 átomos de carbono, con 12 hasta 25 átomos de carbono o con 12 hasta 20 átomos de carbono o puede estar marcada en los ácidos carboxílicos individuales, contenidos en estos intervalos parciales.

60 Como ejemplos, no limitativos, de los ácidos carboxílicos, que puede ser hidroxilados, según la invención pueden citarse: el ácido caprílico, el ácido perlargónico, el ácido cáprico, el ácido undecanoico, el ácido láurico, el ácido tridecanoico, el ácido mirístico, el ácido pentadecanoico, el ácido palmítico, el ácido margarínico, el ácido esteárico, el ácido nonadecanoico, el ácido araquínico, el ácido behénico, el ácido lignocerínico, el ácido cerotínico y el ácido melísico. Ejemplos de derivados adecuados de los ácidos carboxílicos son los ésteres de alquilo con 1 hasta 4 átomos de carbono, las amidas o los anhídridos, preferentemente, de los ácidos carboxílicos de cadena corta con 1 hasta 4 átomos de carbono.

65 De manera preferente, las mono-oxigenasas, según la invención, se derivan de las mono-oxigenasas del citocromo P450 de las clases de enzimas E.C. 1.14.-.-, especialmente de la familia CYP102 de P450, y son eucariotas o procariotas, especialmente de origen bacteriano.

Un grupo, especialmente preferente, de mutantes se deriva de la mono-oxigenasa BM-3 del citocromo P450 procedente de *Bacillus megaterium* con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:2, que presenta, al menos, una mutación funcional en una de las siguientes regiones de la secuencia de aminoácidos: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82 (hélice 5), 86-88 (hélice 6), 172-224 (bucle F/G) y 352-356 (β -hebra 8), con la condición de que esté mutada más de una de estas regiones, cuando el enzima porte la mutación F87A; así como los equivalentes funcionales de estos mutantes.

La mutación correspondiente se indicará, en el ámbito de la presente descripción, según el código de letras para los aminoácidos. Por delante del número, que indica la posición de la mutación en la secuencia, se ha indicado el aminoácido original, detrás del número se ha indicado el aminoácido modificado.

Una “mutación funcional”, en el sentido de la presente invención, abarca un intercambio de aminoácidos en las citadas regiones de la secuencia, que conduzca a un “cuadro modificado de la reactividad” o bien a un “perfil modificado del sustrato” según la definición dada precedentemente.

El objeto de la invención está constituido por mono-oxigenasas del citocromo P450, modificadas, según la reivindicación 1.

Los mutantes preferentes presentan, al menos, uno de los siguientes cuadros de substitución de los aminoácidos:

- a) F87A, L188K;
- b) F87V, L188K;
- c) F87A, L188K; A74G;
- d) F87V, L188K, A74G;
- e) F87A, L188K, A74G, R47F;
- f) F87V, L188K, A74G, R47F;
- g) F87A, L188K, A74G, R47F, V26T; o
- h) F87V, L188K, A74G, R47F, V26T.

El objeto de la invención está constituido, además, por secuencias de ácidos nucleicos, que codifican una mono-oxigenasa mutada o un “equivalente funcional” según la definición precedente. Estas secuencias pueden ser obtenidas, preferentemente, de la SEQ ID NO: 1 mediante intercambio del codón de acuerdo con el cuadro anterior de substitución de los aminoácidos.

Según la invención, quedan abarcadas, también, aquellas secuencias de ácidos nucleicos, que abarquen las mutaciones denominadas silenciosas o que están modificadas, de acuerdo con la utilización del codón de un organismo original especial o de un organismo huésped especial, en comparación con una secuencia citada de manera concreta, así como sus variantes de origen natural. Según la invención, quedan abarcadas, además, las variantes de las secuencias de los ácidos nucleicos, obtenidas mediante degeneración del código genético (es decir, sin modificación de la correspondiente secuencia de aminoácidos) o mediante substitución conservadora de los nucleótidos (es decir, la substitución del correspondiente aminoácido por otro aminoácido con la misma carga, con el mismo tamaño, con la misma polaridad y/o con la misma solubilidad), así como las secuencias modificadas mediante la adición, la inserción, la inversión o la delección de nucleótidos, que codifiquen las mono-oxigenasas según la invención con “perfil modificado del sustrato”, así como las correspondientes secuencias complementarias.

El objeto de la invención está constituido, además, por las construcciones de expresión, que contienen una secuencia de ácidos nucleicos, que codifique un mutante según la invención, bajo el control genético de secuencias reguladoras de ácidos nucleicos; así como por los vectores, que comprendan, al menos, una de estas construcciones de expresión.

De manera preferente, las construcciones, según la invención, abarcan un promotor en la posición 5' aguas arriba de la correspondiente secuencia codificante y una secuencia de terminación en la posición 3' aguas abajo, así como, en caso dado, otros elementos reguladores usuales y, concretamente, enlazados respectivamente de manera operativa con la secuencia codificante. Se entenderá por una fijación operativa la disposición secuencial del promotor, de la secuencia codificante, del terminador y, en caso dado, de otros elementos reguladores de tal manera, que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir su función, según lo establecido, en la expresión de la secuencia codificante. Ejemplos de secuencias que pueden ser enlazadas de manera operativa son las secuencias directrices así como los amplificadores de la traducción, los reforzadores, las señales de poliadenilación, los marcadores de selección, las señales de amplificación, los orígenes para la replicación y similares.

ES 2 291 219 T3

Conjuntamente con las secuencias artificiales de regulación, puede estar presente, además, la secuencia natural de regulación por delante del gen estructural propiamente dicho. En caso dado, con ayuda de la modificación genética puede desconectarse esta regulación natural y puede aumentarse o disminuirse la expresión de los genes. Sin embargo, la construcción génica puede estar constituida, también, de una manera más sencilla, es decir, que no se insertan señales adicionales de regulación por delante del gen estructural y no se eliminará el promotor natural con su regulación. En lugar de ello se mutará la secuencia natural de regulación de tal manera, que ya no se verifique cualquier regulación y que se aumente o se disminuya la expresión génica. Las secuencias de los ácidos nucleicos pueden estar contenidas en una o en varias copias en la construcción génica.

Ejemplos de promotores son: el promotor cos, el promotor tac, el promotor trp, el promotor tet, el promotor trp-tet, el promotor lpp, el promotor lac, el promotor lpp-lac, el promotor lacIq, el promotor T7, el promotor T5, el promotor T3, el promotor gal, el promotor trc, el promotor ara, el promotor SP6, el promotor 1-PR o el promotor 1-PL, que encuentran aplicación, de una manera ventajosa, en las bacterias gram-negativas; así como los promotores gram-positivos amy y SP02, los promotores de levaduras ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH o los promotores vegetales CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o los promotores ubiquitina o los promotores faseolina.

En principio, pueden emplearse todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación. Además, pueden emplearse ventajosamente, también, los promotores sintéticos.

Las citadas secuencias de regulación deben posibilitar la expresión específica de las secuencias de los ácidos nucleicos. Esto puede significar, por ejemplo, según el organismo huésped, que el gen sea expresado o que sea sobreexpresado sólo tras la inducción o que sea expresado y/o que sea sobreexpresado inmediatamente.

De manera preferente, las secuencias o bien los factores de regulación pueden influenciar, en este caso, de manera positiva sobre la expresión y, de este modo, pueden aumentarla o disminuirla. De este modo, podrá llevarse a cabo un reforzamiento de los elementos de regulación ventajosamente en el plano de la transcripción, empleándose potentes señales de transcripción tales como los promotores y/o los “reforzadores”. Además, es posible también un refuerzo de la traducción dado que se mejora, por ejemplo, la estabilidad del ARNm.

La obtención de un casete de expresión se lleva a cabo mediante la fusión de un promotor adecuado con una secuencia adecuada de nucleótidos de la mono-oxigenasa, así como con una señal de terminación o de poliadenilación. Para ello se emplean técnicas usuales de recombinación y de clonación, como las que han sido descritas, por ejemplo, en la publicación de T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en la publicación de T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en la publicación de Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

La construcción recombinante de ácidos nucleicos o bien la construcción génica se inserta, para la expresión, en un organismo huésped adecuado, ventajosamente en un vector específico para el huésped, que posibilite una expresión óptima de los genes en el huésped. Los vectores son perfectamente conocidos por el técnico en la materia y pueden tomarse, por ejemplo, de la publicación “Cloning Vectors” (Pouwels P. H. *et al.*, Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Se entenderán por vectores, además de los plásmidos, también todos los otros vectores conocidos por el técnico en la materia, tales como, por ejemplo, los fagos, los virus, tales como SV40, CMV, los baculovirus y los adenovirus, los transposones, los elementos IS, los fasmidos, los cósmidos y el ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse de manera autónoma en el organismo huésped o se replican de manera cromosómica.

Con ayuda de los vectores, según la invención, pueden prepararse microorganismos recombinantes, que puedan ser transformados, por ejemplo, con al menos un vector según la invención y que puedan ser empleados para la producción de mutantes. Ventajosamente, las construcciones recombinantes, según la invención, precedentemente descritas, se insertarán y se expresarán en un sistema huésped adecuado. En este caso se emplearán, preferentemente, los métodos de clonación y de transfección conocidos por el técnico en la materia, tales como, por ejemplo, la co-precipitación, la fusión de protoplastos, la electroporación, la transfección retroviral y similares, para provocar la expresión de los citados ácidos nucleicos en el correspondiente sistema de expresión. Los sistemas adecuados han sido descritos, por ejemplo, en la publicación *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel *et al.*, Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997.

En principio, son adecuados como organismos huésped todos aquellos organismos, que posibiliten una expresión de los ácidos nucleicos, según la invención, de sus variantes alelofórmicas, de sus equivalentes o derivados funcionales. Se entenderán por organismos huésped, por ejemplo, las bacterias, los hongos, las levaduras, las células vegetales o animales. Los organismos preferentes son las bacterias, como aquellas de los géneros *Escherichia*, tales como por ejemplo *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, los microorganismos eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, células eucariotas superiores procedentes de animales o de vegetales, por ejemplo las células Sf9 o las células CHO.

En caso deseado, podrá provocarse la expresión del producto génico, también, en organismos transgénicos tales como los animales transgénicos, como, especialmente, los ratones, lo corderos o las plantas transgénicas. Del mismo modo, los organismos transgénicos pueden estar constituidos por los denominados animales o plantas con genes inac-

tivos (Knock-Out), en los que se ha desactivado el correspondiente gen endo-génico, tal como por ejemplo por medio de la mutación o por medio de la delección parcial o completa.

La selección de los organismos, que han sido transformados con éxito, puede llevarse a cabo por medio de genes marcadores que, están contenidos, de igual modo, en el vector o en el casete de expresión. Ejemplos de tales genes marcadores son los genes para la resistencia a los antibióticos y para los enzimas, que catalicen una reacción proporcionadora de un color, que provoque una tinción de las células transformadas. Éstas pueden seleccionarse, entonces, por medio de una clasificación automática de las células. Los microorganismos, que hayan sido transformados con éxito con un vector, que porten un gen correspondiente, resistente a los antibióticos (por ejemplo a la G418 o la higromicina), pueden seleccionarse con ayuda de los correspondientes medios o sustratos sólidos nutrientes, que contengan antibióticos. Las proteínas marcadoras, que están presentes en la superficie celular, pueden aprovecharse para la selección con ayuda de la cromatografía de afinidad.

La combinación formada por los organismos huésped y por los vectores adaptados a los organismos, tales como los plásmidos, los virus o los fagos, tales como, por ejemplo, los plásmidos con el sistema ARN-polimerasa/ promotor, los fagos λ , μ u otros fagos moderadores o transposones y/o otras secuencias ventajosas de regulación, forma un sistema de expresión. A modo de ejemplo, debe entenderse por el concepto de "sistema de expresión" la combinación formada por células de mamíferos, tales como las células CHO, y por vectores, tal como el vector pcDNA3neo, que son adecuados para células de mamíferos.

Tal como se ha descrito precedentemente, podrá provocarse la expresión del producto génico, de manera ventajosa, también en animales transgénicos, por ejemplo en ratones, en corderos o en plantas transgénicas. Del mismo modo, es posible programar sistemas de traducción acelulares con el ARN derivado del ácido nucleico.

Además, el objeto de la invención está constituido por procedimientos para la obtención de una mono-oxigenasa, según la invención, mediante el cultivo de un microorganismo productor de la mono-oxigenasa, induciéndose, en caso dado, la expresión de la mono-oxigenasa y aislándose del cultivo la mono-oxigenasa. De este modo, la mono-oxigenasa, según la invención, puede producirse a escala industrial, cuando esto sea deseable.

El microorganismo puede ser cultivado y fermentado de conformidad con los procedimientos conocidos. Las bacterias pueden multiplicarse, por ejemplo, en el medio TB o en el medio LB y a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C y a un valor del pH comprendido entre 6 y 9. En particular, se han descrito las condiciones de cultivo adecuadas, por ejemplo, en la publicación de T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Las células serán sometidas a digestión a continuación, cuando la mono-oxigenasa no sea secretada en el medio de cultivo, y se obtendrá la mono-oxigenasa a partir del lisado de conformidad con los conocidos procedimientos para el aislamiento de las proteínas. Las células pueden someterse a una digestión, a elección, mediante la aplicación de ultrasonidos de alta frecuencia, mediante alta presión, tal como por ejemplo en una célula a presión de French, mediante la osmolisis, mediante la acción de los detergentes, mediante enzimas líticas o por medio de disolventes orgánicos, mediante homogenizadores o mediante la combinación de varios de los procedimientos indicados.

Una purificación de la mono-oxigenasa puede conseguirse con los conocidos procedimientos cromatográficos, tales como la cromatografía con tamices moleculares (filtración en gel), como la cromatografía con sefrosa Q, la cromatografía con intercambio de iones y la cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos usuales, tales como la ultrafiltración, la cristalización, la separación mediante la formación de sales, la diálisis y la electroforesis en gel natural. Los procedimientos adecuados han sido descritos, por ejemplo, en las publicaciones de Cooper, F. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, Verlag Walter de Gruyter, Berlín, New York o de Scopes, R., *Protein Purification*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlín.

Para el aislamiento de la proteína recombinante es especialmente ventajoso emplear sistemas vectoriales u oligonucleótidos, que prolonguen al ADNc en un número determinado de secuencias de nucleótidos y, de este modo, que codifiquen polipéptidos o proteínas de fusión, modificados, que sirven para una purificación más sencilla. Tales modificaciones adecuadas son, por ejemplo, los denominados "Tags", que actúan como cola, tal como por ejemplo la modificación, conocida como cola de hexa-histidina, o los epitopos, que pueden ser reconocidos como antígenos por parte de los anticuerpos (descritos, por ejemplo, en la publicación de Harlow, E. and Lane, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) en prensa).

Estas colas pueden servir para la unión de las proteínas sobre un soporte fijo, tal como, por ejemplo, una matriz polímera, que puede estar cargada, por ejemplo, en una columna para cromatografía, o que puede emplearse en una placa de microtitulación o sobre un soporte de otro tipo.

Al mismo tiempo, estas colas pueden emplearse también para el reconocimiento de las proteínas. Para el reconocimiento de las proteínas pueden emplearse, además, los marcadores usuales tales como los colorantes fluorescentes, los marcadores enzimáticos, que forman un producto de reacción, que puede ser detectado tras la reacción con un sustrato, o marcadores radioactivos, solos o en combinación con las colas para la derivatización de las proteínas.

ES 2 291 219 T3

El objeto de la invención está constituido, además, por procedimientos bioquímicos para la obtención enzimática de ácidos carboxílicos alifáticos hidroxilados en posición terminal o subterminal (ω -1 hasta ω -4), caracterizados porque

- a1) se cultiva, de manera aerobia, un microorganismo recombinante, según la invención, en presencia de un medio de cultivo, que contenga, al menos, un ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado o, al menos, un derivado de ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado; o
- a2) se incuba, de manera aerobia, un medio de reacción, que contenga, al menos, un ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado o, al menos, un derivado de ácido carboxílico que pueda ser hidroxilado, con un mutante según la invención; y
- b) se aísla del medio el producto hidroxilado o la mezcla de productos hidroxilados, que se han formado.

En el procedimiento según la invención pueden ser empleados los ácidos carboxílicos como tales (*per se*) o pueden emplearse los derivados de los mismos, tales como, por ejemplo, los ésteres de alquilo con 1 hasta 4 átomos de carbono o las amidas de los ácidos carboxílicos.

Como ácidos carboxílicos, que puede ser hidroxilados, se emplearán, de manera preferente, en el procedimiento, según la invención, los ácidos monocarboxílicos con 8 hasta 30 átomos de carbono o sus derivados.

De manera especialmente preferente, en el procedimiento, según la invención, se empleará como ácido carboxílico, que puede ser hidroxilado, un ácido monocarboxílico con 8 hasta 12 átomos de carbono o un derivado del mismo y, como mono-oxigenasa, se empleará un mutante según la reivindicación 1.

De manera usual, la reacción de oxidación, según la invención, se llevará a cabo en presencia del oxígeno del aire así como en presencia de un donador de electrones (o equivalente de reducción), tales como, especialmente, el NADH, el NADPH y el sepulcrato de Zn/Co(III). El empleo del sepulcrato de Zn/Co(III) ha sido descrito, por ejemplo, en la publicación DE-A-199 35 115, a la que se hace aquí referencia expresa.

Cuando se lleve a cabo la hidroxilación, según la invención, con un microorganismo recombinante, se llevará a cabo, preferentemente, en primer lugar el cultivo de los microorganismos en presencia de oxígeno y en un medio complejo, tal como, por ejemplo, el medio TB o el medio LB, a una temperatura para el cultivo comprendida, aproximadamente entre 20 y 40°C y con un valor del pH comprendido, aproximadamente entre 6 y 9, hasta que se alcance una densidad celular suficiente. La adición de sustrato exógeno se lleva a cabo según las necesidades. Para poder controlar mejor la reacción de oxidación, se da preferencia al empleo de un promotor inducible, especialmente inducible por medio de la temperatura. En este caso se aumenta la temperatura hasta la temperatura necesaria para provocar la inducción, por ejemplo hasta 42°C en el caso del promotor P_{T_P1} , ésta se mantiene durante un lapso de tiempo suficiente, por ejemplo entre 1 y 10 o entre 5 y 6 horas, para la expresión de la actividad de la mono-oxigenasa y, a continuación, se reduce de nuevo la temperatura hasta un valor comprendido entre aproximadamente 30 y 40°C. El cultivo se proseguirá entonces en presencia de oxígeno durante 12 horas hasta 3 días.

Por el contrario, cuando la oxidación, según la invención, se lleve a cabo con el enzima purificado o enriquecido, se disolverá el mutante enzimático, según la invención, en un medio, que contenga un sustrato exógeno (aproximadamente desde 0,01 hasta 10 mM, o desde 0,05 hasta 5 mM), y se conducirá la reacción, preferentemente en presencia de oxígeno, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 10 y 50°C, tal como por ejemplo entre 30 y 40°C, y con un valor del pH comprendido entre aproximadamente 6 y 9 (tal como por ejemplo el que se establece con de tampón de fosfato o con el de tampón tris 100 hasta 200 mM), así como en presencia de un agente reductor, pudiendo presentar el medio, que contiene el sustrato, además, referido al sustrato, que debe ser oxidado, aproximadamente un exceso molar comprendido entre 1 y 100 veces de equivalentes de reducción. En caso necesario, puede llevarse a cabo en porciones la adición del medio de reducción.

En caso necesario, podrá hacerse pasar oxígeno, en forma en sí conocida, a través del medio de la reacción.

Cuando se llevan a cabo los procedimientos, según la invención, con el enzima enriquecido o purificado, podrán establecerse, por ejemplo, condiciones de reacción siguientes:

Concentración del sustrato:	0,1 hasta 20 mg/ml
Concentración del enzima:	0,1 hasta 10 mg/ml
Temperatura de la reacción:	20 hasta 40°C
pH:	6 hasta 8
Tampón:	Fosfato potásico o tris/HCl 0,05 hasta 0,2 M
Donador de electrones:	Preferentemente se añadirá en porciones (concentración inicial aproximadamente 0,1 hasta 2 mg/ml).

Como paso previo al inicio de la reacción, mediante la adición del donador de electrones, podrá añadirse acetona en una concentración comprendida entre un 1 y un 5% (v/v) para aumentar la actividad y podrá efectuarse una incubación previa de corta duración (entre 1 y 5 minutos) (aproximadamente a 20 hasta 40°C).

El técnico en la materia podrá optimizar las correspondientes condiciones de la reacción por medio de ensayos de rutina, que se desvíen de las condiciones anteriormente indicadas.

Para la generación de variantes con propiedades enzimáticas modificadas se dispone, en el ámbito de la ingeniería de las proteínas, de dos estrategias diferentes: por un lado se dispone del método del “diseño racional” (4) así como del método de la “evolución específica” (5-7). Para obtener éxito con un diseño racional tiene un significado central un modelo estructural tridimensional altamente resuelto así como un conocimiento profundizado del mecanismo enzimático. Mientras que, para el diseño racional se ha indicado la capacidad para generar mutantes enzimáticos, que tengan una elevada actividad frente a los sustratos no naturales (4), frecuentemente no puede ser previsto el efecto que pueden tener las mutaciones individuales, puntuales, de los aminoácidos sobre la estabilidad, sobre la actividad y sobre la especificidad de los mutantes.

Aún cuando han sido depositadas las estructuras tomadas por medio de rayos X de la P450 BM-3 en el banco de datos de proteínas (8), sigue sin ser clara la coincidencia entre el sustrato y la P450 durante la etapa crítica de la hidroxilación (9-11). Para el método de la evolución específica tiene un significado central un método eficaz para un cribado rápido de grandes bibliotecas de mutantes aleatorios. Se ha revelado como aplicable (12, 13) un ensayo óptico para el mutante F87A de la P450 BM-3, que utiliza los ácidos ω -para-nitrofenoxicarboxílicos (pNCA). El mutante individual F87A desplaza la posición de la hidroxilación de los ácidos grasos desde la posición ω -1, ω -2 y ω -3 hacia la posición ω (13) y conduce, además, a una transformación completa de los 12-pNCA en comparación con una transformación del 33%, que se observa en el enzima de tipo natural (12). Puesto que, sin embargo, el dominio de la mono-oxigenasa de la P450 BM-3 abarca más de 400 aminoácidos, el cribado de una biblioteca de los mutantes aleatorios equivalente a buscar una aguja en un pajar.

Para mejorar la eficacia del procedimiento de busca se combinó, según la invención, el procedimiento del diseño racional con el procedimiento de la evolución específica para generar mutantes con una reactividad modificada, especialmente para generar mutantes con especificidad para los ácidos grasos con una longitud media de sus cadenas. El método, según la invención, de la “evolución racional” está basado en un modelado de las proteínas asistido por ordenador, para generar una biblioteca aleatoria virtual y para identificar los restos, que ejerzan una influencia sobre las propiedades deseadas con elevada probabilidad. Se forma una sub-biblioteca mediante una agrupación aleatoria de estos restos y llevándose a cabo un cribado con respecto a los mutantes positivos. A partir de un modelo estructural, se comienza con la determinación de aquellos restos, que sean significativos, posiblemente, para la especificidad de la longitud de la cadena. Para la generación de mutantes con propiedades mejoradas, se modificará el punto de mutación, propuesto por medio del modelo, con ayuda de la mutagénesis de saturación. A continuación, se combinarán entre sí los mutantes individuales, que presenten las mejores propiedades, teniendo en consideración el diseño racional. Mediante el empleo de esta estrategia combinada pudo mejorarse, especialmente, la actividad de la P450 BM-3 para sustratos con una longitud media de la cadena.

Mediante el empleo de esta estrategia, y debido a la homología de la secuencia con respecto al enzima P450 de otro origen, se proporciona al técnico en la materia la posibilidad de preparar, de manera análoga, otros mutantes, que constituyen, también, el objeto de la invención.

La presente invención se explicará ahora con mayor detalle por medio de la siguiente descripción experimental y haciéndose referencia a las figuras adjuntas. En este caso:

la figura 1 muestra la optimización escalonada de la P450 BM-3 para el nuevo sustrato 8-pNCA. Se ha dado la eficacia catalítica con respecto al 8-pNCA para cada mutante (en la unidad $s^{-1}M^{-1}$); y

la figura 2 muestra un modelo del complejo del mutante LARVF de la P450 BM-3 en el sustrato 8-pNCA. Se han representado las cadenas laterales, que presentan las cinco mejores posiciones de mutación y que se combinaron para dar el mutante LARVF (V26T, R47F, A74G, F87V, L188K).

Método 1

Modelado del complejo sustrato-P450 BM-3

El modelado del complejo sustrato-enzima está basado en la estructura, determinada por cristalografía, de la P450 BM-3, transformada en forma de complejo con el ácido palmitoleico (9). Esta estructura ha sido depositada en el banco de datos de proteínas (8). La estructura cristalina descrita, con una resolución de 2,9 Å, contiene cuatro moléculas en una celdilla elemental asimétrica. Se tomó como referencia a la cadena A para el complejo modelado. Como molécula sustrato se generó un modelo de 8-pNCA mediante el empleo del "Molecule Builder" de SYBYL (Tripos, Inc., St. Louis, USA). La mutación F87A se generó mediante el empleo de la herramienta Biopolymer de SYBYL. Los átomos de carbono 1 hasta 4 del sustrato se colocaron en el punto de fijación de acuerdo con los átomos de carbono 6 a 9 del ácido palmitoleico enlazado. Los ángulos de torsión de las cadenas de los ácidos grasos se seleccionaron de acuerdo con la configuración trans. Los ensayos realizados por medio de la RMN para el complejo P450 BM-3-laurato y P450 BM-12-bromolaurato muestran, que los protones de los átomos de carbono hidroxilados (C10 y C11) se encuentran a una distancia aproximada de 3,0 Å del hierro enlazado con la hemoglobina en el nivel de oxidación II (10, 13). Tomándose como base estos resultados se localizaron los correspondientes átomos C7 y C8 del 8-pNCA a una distancia de 4 Å o bien de 3,6 Å del hierro enlazado con la hemoglobina. El grupo para-nitrofenoxi se dispuso manualmente en el casete de fijación. Además, se minimizó la energía del complejo a través de los átomos fijados de la cadena principal.

Método 2

Mutagénesis por saturación

Los mutantes, empleados según la invención, se prepararon con ayuda de la mutagénesis por saturación con empleo del estuche Stratagene QuikChange (La Jolla, California, USA). Para la mutación a través del modelado de la P450 BM-3 se seleccionaron nueve posiciones las proximidades del canal de fijación con el sustrato y, concretamente, la P25, la V26, la R47, la Y51, la S72, la A74, la F87, la L188 y la M354. En la tabla 1 se han reunido los cebadores para cada una de estas posiciones.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 291 219 T3

TABLA 1

Posiciones seleccionadas	Cebador	Secuencia Nr.
P25	5'-gttattaaacacagataaannngttcaagcttgatg-3'	SEQ ID NO: 9
	5'-catcaaagcttgaacnnnttatctgtgttaataac-3'	SEQ ID NO: 10
V26	5'-gttattaaacacagataaaccgnnncaagcttgatg-3'	SEQ ID NO: 11
	5'-catcaaagcttgnnncggttatctgtgttaataac-3'	SEQ ID NO: 12
R47	5'-cgaggcgctggtnnngtaacgcgctactatc-3'	SEQ ID NO: 13
	5'-gataagtagcgcggttacnnnaccaggcgctcg-3'	SEQ ID NO: 14
Y51	5'-cctggctggtgaacgcgcnnnttatcaagtcagc-3'	SEQ ID NO: 15
	5'-gctgacttgataaannngcggttacacgaccagg-3'	SEQ ID NO: 16
S72	5'-gcttgataaaaactannncaagcgcttaaattgtacg-3'	SEQ ID NO: 17
	5'-cgtacaaatttaagcgcttgnnntaagttttatcaaagc-3'	SEQ ID NO: 18
A74	5'-gcttgataaaaactaaagtcannncttaaattgtacg-3'	SEQ ID NO: 7
	5'-cgtacaaatttaagnnntgaettaagttttatcaaagc-3'	SEQ ID NO: 8
L188	5'-gaagcaatgaacaagnnncagcgagcaaatccag-3'	SEQ ID NO: 5
	5'-ctggattgctcgetgnnnctgttcattgctc-3'	SEQ ID NO: 6
M354	5'-ggcgacgaactannngttctgattcctcag-3'	SEQ ID NO: 19
	5'-ctgaggaatcagaacnnntagttcgtcgcc-3'	SEQ ID NO: 20
F87	5'-gcaggagacgggggtgnnnacaagctggacg-3'	SEQ ID NO: 3
	5'-cgtccagcttgnnncaaccccgctcctgc-3'	SEQ ID NO: 4

Las condiciones de la reacción fueron idénticas para todos los procedimientos de mutagénesis por RCP, con excepción de la temperatura de hibridización, que se varió de la manera siguiente: 50°C para las posiciones 25, 26, 188 y 354; 52°C para las posiciones 47 y 51; y 46°C para las posiciones 72, 74 y 87. Las reacciones se llevaron a cabo con un volumen de reacción de 50 µl, conteniendo cada carga 17,5 pmoles de cada cebador, 20 pmoles del ADN plásmido mensajero, 3 U de la Pfu-polimerasa y 3,25 nmoles de cada dNTP. La reacción se inició a 95°C, durante 4 minutos, a continuación recorrió 20 veces el ciclo térmico siguiente: 95°C, 1 minuto; 46-52°C, 2,5 minutos; 72°C, 17 minutos;

ES 2 291 219 T3

al cabo de estos 20 ciclos se prosiguió la reacción durante 15 minutos a 72°C. Para la mutagénesis localmente específica mediante la RCP se modificó un codón individual para el intercambio de un aminoácido. Para el agrupamiento aleatorio de un aminoácido específico se emplearon cebadores, en los cuales “nnn” codifica el aminoácido específico. Todas las soluciones del producto de la RCP se trataron con 20 U de DpnI a 37°C durante 3 horas para digerir el ADN mensajero original, no mutado. A continuación se llevó a cabo la transformación en *E. coli* D85α.

Método 3

Expresión y purificación del enzima de tipo natural así como de los mutantes

El gen de tipo natural de la P450 BM-3 y sus mutantes fueron expresados bajo el control del potente promotor P_RP_L, que puede ser inducido por medio de la temperatura, pCYTEXP1 en *E. coli* cepa DH5α (supE44, lacU169 [80lacZ M15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1). La única mutación puntual F87A se insertó, como es conocido en el estado de la técnica (12). Las células transformadas se distribuyeron en los pocillos de placas de agar LB, que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Al cabo de 12 hasta 24 horas de crecimiento se recogieron las colonias con palillos de dientes estériles y se dispusieron en placas de microtitulación con 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 200 µl de medio TB (12 g de triptofano, 24 g de extracto de levadura, 4 ml de glicerina, H₂O (destilada) hasta 1 litro) con 100 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C. A continuación se tomaron 40 µl de cada pocillo y se transfirieron hasta tubitos de cultivo, que contenían 2 ml de medio TB con 100 µg/ml de ampicilina y a continuación se incubaron durante 2 horas a 37°C y seguidamente se incubaron durante 6 horas a 42°C. Las células se separaron por centrifugación a 4.000 revoluciones por minuto, durante 5 minutos, se trataron con lisozima procedente de proteína de gallina (1 U/ml) y a continuación se congelaron y se descongelaron dos veces. El extracto celular bruto se obtuvo por centrifugación durante 10 minutos a 14.000 revoluciones por minuto. El sobrenadante, obtenido de este modo, se empleó para la medida de la actividad. Para la obtención de grandes cantidades del enzima se empleó un matraz de 2 litros, que puede someterse a trepidaciones, con 300 ml de medio TB con 100 µg/ml de ampicilina, se incubó a 37°C y se aplicaron trepidaciones durante 2 horas a 200 revoluciones por minuto (OD_{578nm} = 0,8 hasta 1,0) y a continuación se incubó durante 6 horas a 42°C. Las células se recolectaron por centrifugación durante 10 minutos a 4.000 revoluciones por minuto y se suspendieron en 15 ml de tampón 0,1 M de fosfato de potasio, pH 7,4. La suspensión, enfriada con hielo, se sometió a digestión con ayuda de un Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Alemania) (80 W, 2 minutos, 3 ciclos). La suspensión se centrifugó durante 20 minutos a 32.570 x g. El extracto bruto se empleó para la determinación de la actividad del enzima o para la purificación del enzima.

La purificación del enzima se llevó a cabo como se ha descrito en (14), empleándose, sin embargo, una instalación de cromatografía BioPilot (Pharmacia, Suecia). La pureza del enzima se fija por medio de la determinación de la proteína total así como mediante la determinación de la cantidad del enzima. La concentración en enzima purificado se determinó por medio de la diferencia entre el espectro de extinción del complejo de carbonilo de la forma hierro-(II), en comparación con la forma hierro-(II), con empleo de una capacidad molecular de absorción de 91 mM⁻¹ cm⁻¹ para el par de longitudes de onda formado por 450 nm y por 490 nm (1).

Método 4

Aislamiento de los mutantes con mayor actividad para sustratos con una longitud más corta de las cadenas

Como ADN mensajero se empleó el mutante F87A de la P450 BM-3, en lugar de emplearse el tipo natural. Se prepararon las mutaciones para la posición correspondiente como se ha descrito precedentemente. Se recolectaron respectivamente, 100 colonias aproximadamente para la exploración del espacio secuencial en cada posición, se cultivaron en tubitos de cultivo y, a continuación, se aislaron células de los mismos y se sometieron a un lisado. Para el ensayo de actividad se emplearon los extractos celulares brutos de cada una de las colonias seleccionadas. Se secuenciaron, para la determinación de las mutaciones, todos los mutantes que mostraron, en comparación con el F87A, una mayor actividad para, al menos, un sustrato con una longitud más corta de la cadena que la del 15-pNCA.

Se seleccionaron, para una combinación ulterior con otras mutaciones, los mutantes con la respectiva actividad máxima para el 12-pNCA, para el 10-pNCA o para el 8-pNCA de todos los mutantes para la misma posición. La mutación combinada se llevó a cabo por etapas mediante la mutagénesis localmente específica. La vía de la combinación ha sido representada en la figura 1. Para cada etapa de la combinación se aislaron seis colonias para la determinación de la especificidad con respecto al sustrato. Se seleccionó una colonia con especificidad representativa con respecto al sustrato y se determinó la especificidad con respecto al sustrato para el enzima puro.

El plásmido de la colonia seleccionada se utilizó para la etapa siguiente de la mutagénesis localmente específica. Se determinaron las mutaciones en los mutantes finales por medio de la secuenciación del ADN (ABI PRISM[®] BigDye[™] estuche Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction y ABI Prism[™] 377 DNA Sequencer).

Método 5

Ensayo de la actividad del enzima

Para el ensayo de la actividad del pNCA se emplearon 8 µl de una solución 10 mM de pNCA en DMSO en una cubeta no reutilizable en un volumen final de 1 ml. Tras la adición de 850 µl del tampón tris/HCl (0,1 M, pH 8,2) y

ES 2 291 219 T3

de 0,1 hasta 0,4 nmoles de P450 a la correspondiente solución de pNCA-DMSO, se sometieron las muestras a una incubación previa durante 5 minutos, antes de efectuarse la iniciación de la reacción mediante la adición de 50 μ l de una solución acuosa de NADPH 1 mM. Para la determinación de K_{cat} y K_m se estableció una serie de concentraciones para los diversos sustratos de pNCA (respecto a los detalles relativos al procedimiento de detección puede hacerse referencia a (12)).

Para la realización del ensayo de los pNCA en una placa de microtitulación, se empleó una placa con 96 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania). La carga de la reacción contenía, en un volumen de reacción total de 250 μ l en el tampón tris/HCl (0,1 M, pH 8,2) bien 60 nmoles de 8-pNCA, o 15 nmoles de 10-pNCA, o 15 nmoles de 12-pNCA o bien 15 nmoles de 15-pNCA, disueltos respectivamente en 2,5 μ l de DMSO. Al cabo de una incubación previa durante 5 minutos, con 40 μ l de muestras de la P450 BM-3, se inició la reacción mediante la inyección de 30 μ l de una solución 1 mM de NADPH en cada pocillo. Las placas se midieron a 405 nm, inmediatamente después de la adición de la solución de NADPH, en un dispositivo láser para placas.

Método 6

Reacción de los ácidos carboxílicos con los mutantes según la invención y determinación de los productos

a) Reacción química

Para la hidroxilación de los ácidos grasos, en presencia de la P450 BM-3 o bien de sus mutantes, se eligió la carga siguiente:

Mutante de la P450 BM-3	20 mg
Tampón para la reacción	20 ml (tris/HCl 50 mM, KCl 250 mM, pH 7,8)
Ácido graso	10 mg
Acetona	400 μ l (2 % v/v) (reacción acelerada con un factor de 2)

El liofilizado del enzima se disolvió, como paso previo a la reacción, en 1 ml de tampón para la reacción y, en primer lugar, se efectuó una incubación durante 30 minutos a 36°C. La incubación condujo, tal como la adición de un 2% en volumen de acetona, a un aumento de la actividad del 60 o bien del 75%.

Al cabo de una incubación durante 5 minutos, se llevó a cabo la adición de 500 μ l de la solución de NADPH preparada de antemano (12,5 mg/ml). El desarrollo de la reacción se siguió con ayuda de las medidas de la absorción a 340 nm, pudiéndose observar el consumo del NADPH. Para una conversión estequiométrica se requerirían teóricamente 4 ml de solución de NADPH, una concentración demasiado elevada en NADPH en la solución de la reacción conduce, sin embargo, a la inactivación del enzima, por lo tanto se añade el cofactor en etapas de 500 μ l.

Una vez concluida la reacción se acidificó la solución con ácido clorhídrico 5M hasta un valor del pH de 2. En este caso se separan por precipitación los ácidos grasos o bien los ácidos grasos hidroxilados y conducen a una turbidez visible de la solución. A continuación se extrajo dos veces con 10 ml, cada vez, de diclorometano y se secó sobre sulfato de sodio. Tras la filtración sobre un filtro de pliegues se llevó a cabo la separación del diclorometano en el evaporador rotativo o mediante evaporación en nitrógeno. El producto sólido blanco, remanente, se recogió a continuación de nuevo en 2 ml de diclorometano y se empleó para el análisis mediante la GC.

b) Análisis por cromatografía gaseosa

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo para gases Fisons (Fisons Instruments Mega Series, Mainz, Alemania) con FID (columna Optima 5, 25 m x 0,25 mm diámetro interno, Macherey & Nagel, Düren, Alemania).

Para el análisis se sometieron los eductos y los productos a una sililación con MSHFBA. En este caso, se transformaron todos los grupos hidroxilo y todos los grupos ácido en los correspondientes trimetilsililéteres o bien en los trimetilsililésteres. En este caso deben tomarse precauciones para que la muestra sea anhidra, puesto que, en otro caso, se producen reacciones secundarias con los agentes de sililación. Se añadieron, por medio de una pipeta, a 10 μ l de la solución de diclorometano, que contiene los ácidos hidroxigrasos, 15 μ l de MSHFBA y se incubaron durante 15 minutos a la temperatura ambiente. Tras la adición de 25 μ l de diclorometano se llevó a cabo el análisis por medio de la GC.

ES 2 291 219 T3

Para ello se inyectó 1 μ l de las muestras sililadas en el cromatógrafo para gases. La temperatura del inyector y del detector era de 350°C. Se utilizaron los siguientes programas de temperatura:

Ácido caprílico

100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 200 °C $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Ácido cáprico

100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 140 °C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Ácido láurico

100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 170 °C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Ejemplo 1

Selección de los mutantes iniciales

Se empleó como matriz de partida el mutante individual F87A de la P450 BM-3. Tal como ya se ha indicado, con ayuda de esta mutación se desplaza (13) la posición de la hidroxilación en los ácidos grasos saturados con 12 y con 14 átomos de carbono de ω -1, ω -2 y ω -3 hacia la posición ω . Para la reacción del 12-pNCA y del 15-pNCA se observó, igualmente, que la ω -hidroxilación es significativamente más potente (12) en comparación con la del tipo natural. Para la ω -hidroxilación del 12-pNCA se obtiene una transformación completa, en comparación con una transformación al 33% para el tipo natural. Además de la mayor regioselectividad, se observan, también, mayores actividades para el 12-pNCA y para el 15-pNCA (véase la tabla 2).

TABLA 2

Actividad específica de mutantes seleccionados de la P450 BM-3 para diversos derivados de pNCA con longitudes variables de la cadena¹

Substrato	WT	F87A	L188K	V26T	R47F	S72G	A74G	M354T
15-pNCA	405	410	288	519	258	439	474	560
12-pNCA	141	284	316	555	233	596	517	480
10-pNCA	339	92	207	106	52	150	103	171
8-pNCA	15	2	69	16	13	3	6	4
¹ Unidades de la actividad específica: nmol/min/nmol de P450								

La mayor regioselectividad del F87A puede entenderse por medio del modelo estructural. La substitución del resto bloqueador F87 por la alanina aumenta la bolsa de fijación para el grupo p-nitrofenoxi, que se forma por el F87, además de por el V78, A82, el T260, el I263 y el A264. Por otra parte, se facilita el acceso del grupo p-nitrofenoxi grande a la bolsa de fijación y se eliminan las interacciones estéricas entre el F87 y los átomos de carbono ω -2 y ω -1 de los pNCA. Esto posibilita una orientación ventajosa de la posición ω frente al átomo de hierro enlazado con la hemoglobina.

Ejemplo 2

Selección de posiciones individuales de la mutación por medio del modelado, de la mutagénesis aleatoria localmente específica de posiciones seleccionadas y cribado

1. Selección de las posiciones de mutación

El modelo del sustrato C8-pNCA enlazado muestra, que el carboxilato se encuentra a una distancia de 9 y 11 Å con respecto a los restos fijadores del carboxilato R47 o bien Y51. Para inducir actividad frente a los sustratos C8, es necesario generar un nuevo punto de fijación, que se encuentre a una distancia adecuada con respecto al grupo carboxilato del sustrato. Para facilitar la fijación del 8-pNCA deberían colocarse restos adicionales dentro del punto de fijación. Se han seleccionado los restos siguientes: los restos R47 e Y51, que forman los puntos originales de fijación del carboxilato. Para R47 se ha propuesto la formación de un par de iones entre su grupo guanidinio y el resto carboxilato del sustrato; Y51 forma un puente de H con el grupo carboxilato del sustrato (9). Para el complejo de ácido palmitoleico/P450 BM-3, toma un valor de 12 Å la distancia entre el átomo de carbono C_α de R47 y el átomo de carbono del grupo carboxilato de los ácidos grasos. Se determinaron todos los restos en el hemisferio con un radio de 12 Å alrededor del grupo carboxilato del modelo 8-pNCA y únicamente se seleccionaron aquellos con cadenas laterales dentro de la bolsa de fijación, que estuviesen dirigidas hacia el grupo carboxilato de los ácidos grasos. De este modo, se seleccionaron el P25, el V26, el S72, el A74, el L188 y el M354, que, probablemente, pueden formar un nuevo punto de fijación del carboxilato para compuestos de pNCA de cadena corta. Estos seis restos seleccionados se encuentran sobre elementos estructurales secundarios con una conformación flexible (11).

2. Mutación y cribado

Se generaron mutantes de cada uno de los ocho restos seleccionados mediante la distribución aleatoria localmente específica del codón de tipo natural sobre las posiciones correspondientes. Con el fin de asegurar que fuese ensayada la mayoría de los 19 posibles tipos de aminoácidos, se aislaron 100 colonias de cada posición, se cultivaron y se ensayaron en cuanto a la actividad. (De este modo la probabilidad de ensayar cada aminoácido es mayor que el 95%, con excepción de una probabilidad del 79% para el triptofano y para la metionina). Se seleccionaron los mutantes con un valor de actividad más elevado para, al menos, un sustrato, con una longitud mas corta de la cadena más cortas que la del 15-pNCA para la secuenciación destinada a la determinación de la mutación (mutaciones).

Se observa que la posición 188 es relativamente variable. La mayoría de las 100 colonias mostraron actividad para los pNCA. Entre éstas se seleccionaron 37 colonias de acuerdo con su actividad frente al 8-pNCA. Se detectaron 16 tipos diferentes de aminoácidos, con inclusión del tipo natural. Este resultado demostró, además, que la elección de 100 colonias era suficiente para asegurar que pudiera ser ensayada la mayoría de los 20 posibles aminoácidos. Dentro de las 15 substituciones, las substituciones K, R, W, Q, N, G, A y S, aumentaron significativamente la actividad catalítica para sustratos con una longitud mas corte de ja cadena. La substitución de L por aminoácidos, cargados negativamente, condujo a una actividad de tres a siete veces menor frente al 10-pNCA, frente al 12-pNCA y frente al 15-pNCA.

Las otras siete posiciones se distribuyeron de manera aleatoria de manera similar a la de la posición 188. Se seleccionaron entre 7 y 19 colonias de cada posición para la secuenciación del ADN con el fin de demostrar la mutación (mutaciones). La mayoría de estos genes no había sido mutada o el producto génico mostró una actividad menor para los sustratos con una longitud más corta de la cadena (el ensayo se llevó a cabo con el enzima puro). Respectivamente, tan solo un mutante de las posiciones 26, 47, 74 y 354, dos mutantes de la posición 72 y ningún mutante de las posiciones P25 e Y51 mostraron una mayor actividad, en comparación con el 15-pNCA, para sustratos con una longitud mas corta de la cadena. Los mutantes con la máxima actividad para el 8-pNCA en la posición 188 y en la posición 72 así como todos los mutantes individuales de las posiciones 26, 47, 74 y 354 fueron seleccionados para una combinación. Estas mutaciones, que han sido enumeradas en la tabla 2 anterior, contienen las siguientes substituciones: V26T, R47F, S72G, A74G, L188K y M354T. La actividad específica se aumentó frente al 8-pNCA, en comparación con el F87A, en un factor comprendido entre 0,5 y 33,5. Cada una de estas mutaciones se combinó por etapas con la mutación original F87A.

Ejemplo 3

Mutantes múltiples, preparados mediante la combinación por fases de mutantes y su cribado

1. Mutante L (F87A, L188K)

La elección del primer mutante es crítica, puesto que la combinación de los mutantes individuales no tiene que resultar, necesariamente, en una acumulación de los efectos individuales. Una elección errónea de la primera mutación podría derivarse hacia una vía de evolución, que no condujese a una mutación múltiple, óptima. Por lo tanto, en el caso de un gran conjunto inicial de mutantes individuales es probable una enorme multiplicidad combinatoria y, por consiguiente, es improbable encontrar los mutantes múltiples deseados.

Para la elección del mutante L como punto de partida deben tenerse en cuenta dos criterios: su elevada actividad frente al 8-pNCA en comparación con todos los otros mutantes (tabla 2), así como las modificaciones en la interacción enzima-sustrato y de las propiedades del punto de fijación. Para verificar estas modificaciones se generaron modelos estructurales de los mutantes seleccionados de tal manera, que se reemplazaron las cadenas laterales de las posiciones de la mutación con ayuda del método SYBYL. El L188 está localizado en el extremo C-terminal de la α -hélice F. Esta hélice y la hélice G contigua sufren el mayor desplazamiento debido a una fijación sobre el sustrato (9). El modelo pone de manifiesto, que un intercambio de leucina por lisina conduce a la formación de un nuevo punto putativo de fijación del carboxilato. La distancia entre el grupo amino de K188 y el resto carboxilato del 8-pNCA es de 6 Å y, por lo tanto, es comparable al valor de la distancia, determinado experimentalmente, entre el grupo carboxilato del ácido palmitoleico y el grupo guanidinio de R47 (el resto de fijación original). La distancia entre el grupo de guanidinio de R47 y el grupo carboxilato del 8-pNCA es de 11,4 Å. Por lo tanto, puede proponerse que las interacciones del par de iones entre el grupo carboxilato del sustrato y del K188 se verifican junto con el átomo C8 hidroxilado a una distancia reactiva con respecto al átomo de hierro enlazado con la hemoglobina.

Los otros cinco mutantes se combinaron por etapas con el mutante L mediante mutagénesis localmente específica (véase la figura 1). Para cada etapa de la mutagénesis se generó un modelo estructural de los mutantes seleccionados. Por medio de este modelo se ensayó el influjo de los mutantes generados sobre la fijación con el sustrato y se propuso, a partir de esto, una explicación racional para las propiedades optimizadas de los mutantes y de sus combinaciones.

2. Mutante LA (F87A, L188K, A74G)

La efectividad catalítica frente al 8-pNCA quedó aumentada por medio de la introducción de la mutación A74G en el mutante L. El A74 se encuentra en el extremo N-terminal de la α -hélice B'. Puesto que las cadenas laterales de A74 interaccionan estéricamente con el grupo amino de K188, se elimina esta interacción mediante un intercambio de A74 por glicina, con lo cual se posibilita una orientación más ventajosa de la cadena lateral frente al grupo carboxilato del sustrato.

3. Mutante LAR (F87A, L188K, A74G, R47F)

La mejora de la eficacia catalítica para 8-pNCA se consigue mediante la inserción de la mutación adicional R47F. La mutación R47F tiene dos posibles efectos. La fenilalanina impide la fijación original del carboxilato y aumenta el segmento hidrófobo, sometido al disolvente, al inicio del canal de fijación, que está formado por los restos F11, L14, L17, P18, P45 y A191 (véase la figura 2). Este segmento hidrófobo tiene un significado especial para la fijación con el sustrato (11).

4. Mutante LARV (F87A, L188K, A74G, R47F, V26T)

Cuando se introduzca la mutación M354T al mutante LAR, se reducirá K_{cat} para el 8-pNCA. Por lo tanto, no se tomó en consideración el M354T en otros ensayos combinatorios. Sin embargo, si se introduce la mutación V26T al mutante LAR, el mutante resultante LARV mostrará un valor K_{cat} ligeramente mayor y un valor K_m ligeramente menor que el de LAR. Queda aumentada la eficacia catalítica frente al 8-pNCA. Si, en lugar de ello, se lleva a cabo la mutación S72G en el mutante LAR, se reducirá K_{cat} para el 8-pNCA. Por este motivo se seleccionó el mutante LARV para otras mutaciones.

El V26 está localizado en el extremo N-terminal de la α -hélice A. El modelo indica que T26 podría jugar el papel del resto original Y51 del punto de fijación y que el grupo carboxilato del sustrato podría estabilizarse mediante la formación de un puente de H. La distancia entre el grupo hidroxilo de T26 y el grupo amino de K188 es de 6,9 Å. En comparación con el punto de fijación original, esta distancia es aproximadamente 2 Å mayor (4,8 Å entre el grupo hidroxilo de Y51 y el grupo guanidinio de R47). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la hélice F, que contiene al K188, sea sometida a otras modificaciones de conformación, debido a que su 8-pNCA está fijado en una posición más profunda en la región de fijación y a que se reduce la distancia comprendida entre T26 y K188.

5. Mutante LARVF (F87V, L188K, A74G, R47F, V26T)

Pudo observarse, que la posición 87 tiene un significado especial para la actividad catalítica y para la especificidad con respecto al sustrato del enzima (3, 13). Por lo tanto, el mutante LARV se optimizó en la posición 87 mediante mutagénesis aleatoria, localmente específica. Se obtuvo un mutante, entre 100 colonias, que presentó una eficacia catalítica de $3,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ frente al 8-pNCA. Los datos de la secuencia del ADN indicaron que la alanina había sido reemplazada en la posición 87 por la valina.

A partir de la estructura cristalina (11) y de experimentos anteriores (3, 13) se sabe que el R87 es importante para el acceso del sustrato al hierro enlazado con la hemoglobina. El grupo bloqueador para-nitrofenilo de este sustrato hizo necesario aumentar el tamaño del punto de fijación mediante el intercambio de la fenilalanina por alanina. Mediante el intercambio de A87 por valina se mejora el contacto del C_{ω} con el átomo de hierro enlazado a la hemoglobina debido a las interacciones estéricas entre el oxígeno del éter y la cadena lateral de V87.

ES 2 291 219 T3

Los datos muestran que dos etapas clave, la F87A para dar L y la LARV para dar LARVF, aumentan la eficacia catalítica frente al 8-pNCA. Por lo tanto, se plantea la cuestión si otras mutaciones en el mutante LARVF podrían retrotraerse de nuevo sin que se perdiese la actividad para el 8-pNCA. Por lo tanto, se prepararon mutantes que contenían la mutación F87V, en lugar de la mutación F87A. Estos mutantes portan las siguientes denominaciones:

- 1.) L7V con las mutaciones F87V L188K
- 2.) AL7V con las mutaciones F87V L188K A74G
- 3.) ARL7V con las mutaciones F87V L188K A74G R47F

En los ensayos de actividad se obtuvieron los resultados siguientes:

TABLA 3

Parámetros cinéticos de los mutantes P450 BM-3 para derivados de los pNCA con diversas longitudes de la cadena, determinados a pH 8,0 y a 25°C

	Kcat (s ⁻¹)			Km (μM)			Kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)		
	12	10	8	12	10	8	12	10	8
F87V	0,7	1,8	-	3,8	8,5	-	1,7·10 ⁵	2,1·10 ⁵	-
L7V	2,8	4,7	-	6,4	14,2	-	4,3·10 ⁵	3,3·10 ⁵	-
AL7V	2,2	5,9	4,3	15,1	22,7	197,6	1,4·10 ⁵	2,6·10 ⁵	2,0·10 ⁴
ARL7V	1,4	5,5	3,9	8,9	17,5	41,4	1,7·10 ⁵	3,1·10 ⁵	9,3·10 ⁴
ARVLF	1,4	7,2	0,2	12,3	44,8	6,5	9,2·10 ⁴	1,6·10 ⁵	3,5·10 ⁴

Los resultados muestran, que los mutantes F87V y L7V no presentan una conversión medible para el sustrato 8-pNCA. Los resultados muestran, además, que el mutante cuádruple ARL7V presenta todavía una eficacia catalítica mejor que la del mutante quíntuple ARVLF.

Los mutantes ARL7V y ARVLF muestran, además, elevadas actividades para el ácido cáprico (C10), que es dos átomos de carbono más corto que el sustrato natural de los ácidos grasos, de menor longitud, del enzima de tipo natural. Además, se observaron productos ω-4-monohidroxilados, cuando se utilizó el ácido láurico (C12) como sustrato, mientras que, por el contrario, el enzima de tipo natural de la P450 BM-3 es activo únicamente en las posiciones ω-1, ω-2 y ω-3.

Ejemplo 4

Determinación de la posición preferente de la hidroxilación para ácidos carboxílicos con diversas longitudes de la cadena y con diversos mutantes y comparación con el enzima de tipo natural

Las cargas de la reacción se preparan y se analizan según el método 6, precedentemente descrito.

Los resultados han sido reunidos en la tabla 4 siguiente.

ES 2 291 219 T3

TABLA 4

Posiciones de hidroxilación	Ácido cáprico (C10) [%]	Ácido láurico (C12) [%]
Tipo natural		
ω -3	-	34
ω -2	-	28
ω -1	-	38
Mutante L7V		
ω -3	-	53
ω -2	-	30
ω -1	-	17
Mutante F87V		
ω -3	-	51
ω -2	-	25
ω -1	-	24
Mutante AL7V		
ω -3	-	28
ω -2	-	54
ω -1	-	18
Mutante ARL7V		
ω -3	14	35
ω -2	33	50
ω -1	53	15
Mutante ARVLF		
ω -3	15	34
ω -2	30	53
ω -1	55	13

En el caso de la hidroxilación del ácido láurico, es llamativo, en primer lugar, un cambio de la regioselectividad cuando se produce la transición desde el tipo natural a la P450 BM-3 F87V, que cataliza, preferentemente, una ω -3-hidroxilación, igual que la P450 BM-3 L7V. En el caso de la transición para dar mutantes triples se modifica de nuevo la regioselectividad, dirigiendo el P450 BM-3 AL7V, el P450 BM-3 ARL7V y el P450 BM-3 ARVLF la hidroxilación, preferentemente, hacia la posición ω -2.

Todos los análisis, realizados por medio de la GC, muestran que el ácido cáprico es convertido únicamente por el P450 BM-3 ARVLF y por el P450 BM-3 ARL7V, en el caso de los otros mutantes se observó una conversión por debajo del 1%. Ambos enzimas presentan una regioselectividad casi idéntica, con preferencia en la posición ω -1.

Para la determinación de los rendimientos de la reacción, se registraron cromatogramas gaseosos de patrones. Como patrón del educto se utilizó una solución de ácido cáprico o bien de ácido láurico con diclorometano a modo de disolvente (concentración 0,5 mg/ml). Las superficies de los picos del educto y de los productos no pueden ser comparadas simplemente entre sí debido a los métodos de detección FID, puesto que las moléculas con una fórmula estructural y con una fórmula en bruto diferentes generan flujos diferentes de iones durante la combustión. Estos flujos de iones no son proporcionales a la relación másica cuantitativa entre el educto y los productos. Como patrón para el producto se utilizó, por lo tanto, el ácido 10-hidroxicáprico o bien el ácido 12-hidroxiláurico, que pueden ser adquiridos en el comercio. Las fórmulas brutas de los patrones y de los productos son iguales y la estructura se diferencia únicamente en la posición del grupo hidroxilo, con lo cual, en el caso de cantidades iguales del producto se supondrán flujos detectables aproximadamente iguales de iones.

En el caso de las hidroxilaciones del ácido cáprico con catálisis mediante el P450 BM-3 ARVLF y el P450 BM-3 ARL7V, los rendimientos acumulados en producto fueron del 57% o bien del 38%. En el caso de las hidroxilaciones del ácido láurico, el rendimiento fue del 51% con catálisis por medio del P450 BM-3 ARVLF, con todos los otros mutantes y con el tipo natural el rendimiento está comprendido entre el 38% y el 40%.

Literatura

1. Boddupalli, S. S., *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4233-4239
2. Capdevila, J. H., *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 22663-22671
3. Graham-Lorence, S., *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1127-1135
4. Cleland, J. L. y Craik, C. S., Eds. (1996) *Protein Engineering: Principles and Practice*, Wiley-Liss, New York
5. Kuchner, O. y Arnold, F. H., (1997) *Trends Biotechnol.* 15, 523-530
6. Stemmer, W. P.C. (1994) *Nature* (Londres) 370, 389-391
7. Bornscheuer, U. T., (1998) *Angew. Chem* 110, 3285-3288
8. Bernstein, F. C., *et al.*, (1977) *J. Mol. Biol.* 112, 525-542
9. Li, H. y Poulos, T. L. (1997) *Nat. Structural Biol.* 4, 140-146
10. Modi, S., *et al.*, (1996) *Nat. Structural Biol.* 3, 414-417
11. Ravichandran, K. G., *et al.*, (1993) *Science* 261, 731-736
12. Schwaneberg, U., *et al.*, (1999) *Anal. Biochem.* 269, 359-366
13. Oliver, C.F., *et al.*, (1997) *Biochemistry*, 36, 1567-1572
14. Schwaneberg, U., *et al.*, *J. Chromatography A*, en prensa
15. Cherry, J. R., *et al.*, (1999) *Nature Biotechnology*, 17, 379-384.

REIVINDICACIONES

1. Mono-oxigenasa del citocromo P450, modificada, que presenta un perfil modificado del sustrato, mediante mutagénesis localmente específica de su región de fijación con el sustrato, en comparación con el tipo natural, en la hidroxilación enzimática terminal y/o subterminal de los ácidos carboxílicos alifáticos; derivada de la mono-oxigenasa BM-3 del citocromo P450 procedente de *Bacillus megaterium*, con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:2, que contiene, al menos, respectivamente una mutación funcional en las posiciones 87 y 188 de la secuencia de aminoácidos y, en caso dado, al menos una mutación funcional en una de las posiciones de la secuencia de aminoácidos siguientes: 26, 47, 72, 74 y 354; verificándose que

- Phe 87 está reemplazado por Val, por Ala o por Leu;
- Leu 188 está reemplazado por Asn, por Gln, por Arg, por Lys, por Ala, por Gly, por Ser o por Trp;
- Ala 74 está reemplazado por Val o por Gly;
- Arg 47 está reemplazado por His, por Tyr o por Phe;
- Val 26 está reemplazado por Ser o por Thr,
- Ser 72 está reemplazado por Ala, por Val, por Leu, por Ile o por Gly; o
- Met 354 está reemplazado por Ser o por Thr.

2. Mono-oxigenasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque presenta, al menos, uno de los siguientes cuadros de sustitución de los aminoácidos:

- b) F87A L188K;
- c) F87V L188K;
- d) F87A L188K A74G;
- e) F87V L188K A74G;
- f) F87A L188K A74G R47F;
- g) F87V L188K A74G R47F;
- h) F87A L188K A74G R47F V26T; o
- i) F87V L188K A74G R47F V26T.

3. Secuencia de ácidos nucleicos, que codifica una mono-oxigenasa, según una de las reivindicaciones precedentes, y su secuencia complementaria de ácidos nucleicos.

4. Construcción de expresión, que contiene una secuencia codificante bajo el control genético de secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, que abarca una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 3.

5. Vector, que abarca al menos una construcción de expresión según la reivindicación 4.

6. Microorganismo recombinante, que contiene, al menos, un vector según la reivindicación 5.

7. Microorganismo según la reivindicación 6, seleccionado entre bacterias del género *Escherichia*.

8. Procedimiento para la obtención enzimática de ácidos carboxílicos alifáticos hidroxilados en posición terminal o subterminal, **caracterizado** porque

- a1) se cultiva un microorganismo recombinante, según las reivindicaciones 6 o 7, en presencia de un medio de cultivo, que contenga, al menos, un ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado o, al menos, un derivado del ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado; o
- a2) se incuba un medio de reacción, que contenga, al menos, un ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado o, al menos, un derivado de ácido carboxílico, que pueda ser hidroxilado, con un enzima según una de las reivindicaciones 1 y 2; y
- b) se aísla del medio el producto hidroxilado formado.

ES 2 291 219 T3

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque se emplea un ácido monocarboxílico con 8 hasta 12 átomos de carbono, o un derivado del mismo, como ácido carboxílico, que puede ser hidroxilado,.

5 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 y 9, **caracterizado** porque la reacción se lleva a cabo en presencia de un donador de electrones o de un equivalente de reducción.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el donador de electrones, o el equivalente de reducción, se elige entre el NADH, el NADPH y el sepulcrato de Zn/Co(III).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



Fig. 1

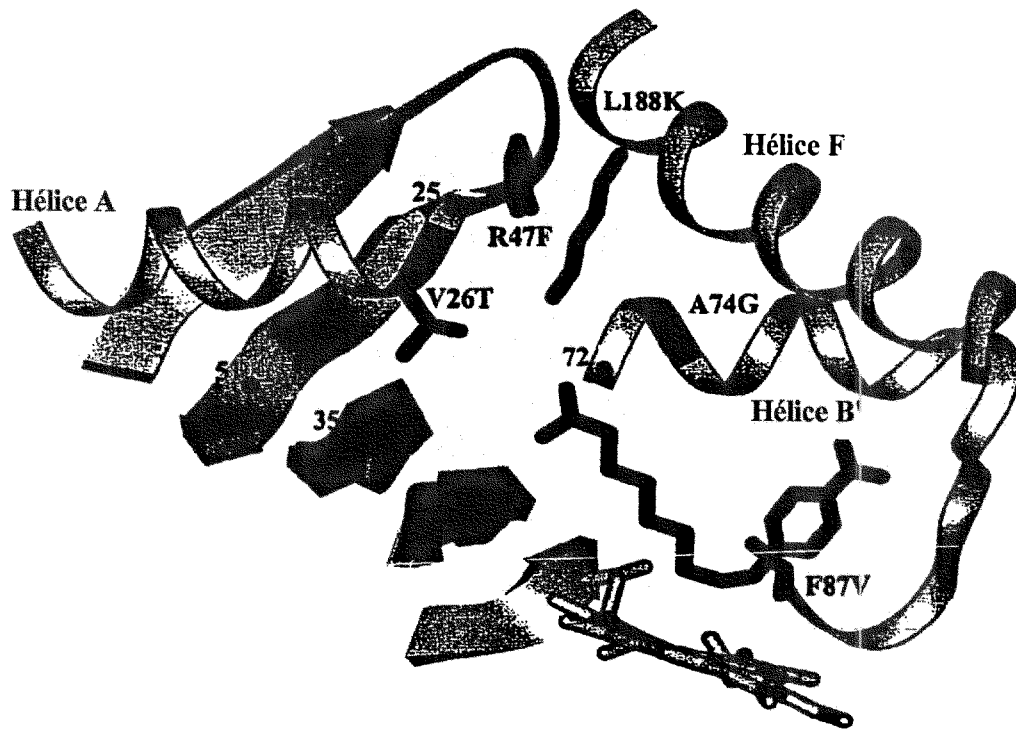


Fig.2

ES 2 291 219 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF Aktiengesellschaft
 <120> Mono-oxigenasa de citocromo P450, modificada
 5 <130> M/40434
 <140>
 <141>
 10 <160> 20
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 3150
 15 <212> DNA
 <213> *Bacillus megaterium*
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (4)..(3150)
 <400> 1

25 atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa 48
 Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys
 30 1 5 10 15
 aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa 96
 Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys
 35 20 25 30
 att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt 144
 40 Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg
 35 40 45
 gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat 192
 45 Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp
 50 55 60
 50 gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt 240
 Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg
 65 70 75

55

60

65

ES 2 291 219 T3

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

ES 2 291 219 T3

	Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg	
	240	245 250 255
5	tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt	816
	Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly	
	260	265 270
10	ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta gtg aaa aat cca cat gta tta	864
	Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu	
	275	280 285
15	caa aaa gca gca gaa gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca	912
	Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro	
	290	295 300
20	agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac	960
	Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn	
	305	310 315
25	gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca	1008
	Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala	
30	320	325 330 335
	aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac	1056
	Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp	
35	340	345 350
	gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg	1104
	Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp	
40	355	360 365
	gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt	1152
	Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser	
45	370	375 380
	gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg	1200
	Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala	
50	385	390 395
	tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt	1248
55	Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly	

ES 2 291 219 T3

	400	405	410	415	
	atg atg cta aaa cac ttt gac ttt gaa gat cat aca aac tac gag ctg	1296			
5	Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu				
	420	425	430		
	gat att aaa gaa act tta acg tta aaa cct gaa ggc ttt gtg gta aaa	1344			
10	Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys				
	435	440	445		
	gca aaa tcg aaa aaa att ccg ctt ggc ggt att cct tca cct agc act	1392			
15	Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr				
	450	455	460		
	gaa cag tct gct aaa aaa gta cgc aaa aag gca gaa aac gct cat aat	1440			
20	Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn				
	465	470	475		
	acg ccg ctg ctt gtg cta tac ggt tca aat atg gga aca gct gaa gga	1488			
25	Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly				
	480	485	490	495	
	acg gcg cgt gat tta gca gat att gca atg agc aaa gga ttt gca ccg	1536			
30	Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro				
	500	505	510		
	cag gtc gca acg ctt gat tca cac gcc gga aat ctt ccg cgc gaa gga	1584			
35	Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly				
	515	520	525		
	gct gta tta att gta acg gcg tct tat aac ggt cat ccg cct gat aac	1632			
40	Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn				
	530	535	540		
	gca aag caa ttt gtc gac tgg tta gac caa gcg tct gct gat gaa gta	1680			
45	Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val				
	545	550	555		
	aaa ggc gtt cgc tac tcc gta ttt gga tgc ggc gat aaa aac tgg gct	1728			
50	Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala				
	560	565	570	575	

ES 2 291 219 T3

	act acg tat caa aaa gtg cct gct ttt atc gat gaa acg ctt gcc gct	1776
	Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala	
5	580 585 590	
	aaa ggg gca gaa aac atc gct gac cgc ggt gaa gca gat gca agc gac	1824
	Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp	
10	595 600 605	
	gac ttt gaa ggc aca tat gaa gaa tgg cgt gaa cat atg tgg agt gac	1872
	Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp	
15	610 615 620	
	gta gca gcc tac ttt aac ctc gac att gaa aac agt gaa gat aat aaa	1920
20	625 630 635	
	Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys	
	tct act ctt tca ctt caa ttt gtc gac agc gcc gcg gat atg ccg ctt	1968
25	640 645 650 655	
	Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu	
	gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa	2016
30	660 665 670	
	Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu	
	ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa	2064
35	675 680 685	
	Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu	
	ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att	2112
40	690 695 700	
	Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile	
	cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc	2160
45	705 710 715	
	Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly	
	cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta	2208
50	720 725 730 735	
	Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu	
55		
	gct cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa	2256

ES 2 291 219 T3

	Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln	
	740	745 750
5	tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg cag ctt cgc gca atg	2304
	Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met	
	755	760 765
10	gct gct aaa acg gtc tgc ccg ccg cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg	2352
	Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu	
	770	775 780
15	ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca	2400
	Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr	
	785	790 795
20	atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgt gaa atg aaa ttc agc	2448
	Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser	
	800	805 810 815
25	gaa ttt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att	2496
	Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile	
	820	825 830
30	tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc	2544
	Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser	
	835	840 845
35	gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att	2592
	Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile	
	850	855 860
40	gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc	2640
	Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys	
	865	870 875
45	ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa	2688
	Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu	
	880	885 890 895
50	acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga	2736
	Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg	
55		
60		
65		

ES 2 291 219 T3

	900	905	910	
	ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt			2784
5	Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu			
	915	920	925	
10	gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat			2832
	Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr			
	930	935	940	
15	ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg			2880
	Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr			
	945	950	955	
20	ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt			2928
	Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val			
25	960	965	970	975
	cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat			2976
	Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp			
30	980	985	990	
	caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct			3024
35	Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro			
	995	1000	1005	
40	gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg			3072
	Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val			
	1010	1015	1020	
45	agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc			3120
	Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly			
	1025	1030	1035	
50	cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa			3150
	Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly			
55	1040	1045		

<210> 2

<211> 1048

60 <212> PRT

<213> *Bacillus megaterium*

65

ES 2 291 219 T3

<400> 2

5	Thr	Ile	Lys	Glu	Met	Pro	Gln	Pro	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Leu	Lys	Asn
	1				5					10					15	
	Leu	Pro	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Lys	Pro	Val	Gln	Ala	Leu	Met	Lys	Ile
10					20				25					30		
	Ala	Asp	Glu	Leu	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Phe	Glu	Ala	Pro	Gly	Arg	Val
					35				40					45		
15	Thr	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ser	Gln	Arg	Leu	Ile	Lys	Glu	Ala	Cys	Asp	Glu
					50			55						60		
	Ser	Arg	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Ser	Gln	Ala	Leu	Lys	Phe	Val	Arg	Asp
20					65			70				75			80	
	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Leu	Phe	Thr	Ser	Trp	Thr	His	Glu	Lys	Asn	Trp
25					85				90					95		
	Lys	Lys	Ala	His	Asn	Ile	Leu	Leu	Pro	Ser	Phe	Ser	Gln	Gln	Ala	Met
					100				105					110		
30	Lys	Gly	Tyr	His	Ala	Met	Met	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Gln
					115				120					125		
	Lys	Trp	Glu	Arg	Leu	Asn	Ala	Asp	Glu	His	Ile	Glu	Val	Pro	Glu	Asp
35					130			135						140		
	Met	Thr	Arg	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ile	Gly	Leu	Cys	Gly	Phe	Asn	Tyr
40					145			150				155			160	
	Arg	Phe	Asn	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asp	Gln	Pro	His	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser
					165				170					175		
45	Met	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	Glu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	Gln	Arg	Ala	Asn
					180				185					190		
50	Pro	Asp	Asp	Pro	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Lys	Arg	Gln	Phe	Gln	Glu	Asp
					195				200					205		
	Ile	Lys	Val	Met	Asn	Asp	Leu	Val	Asp	Lys	Ile	Ile	Ala	Asp	Arg	Lys
55					210				215					220		
	Ala	Ser	Gly	Glu	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Leu	Thr	His	Met	Leu	Asn	Gly

ES 2 291 219 T3

	225	230	235	240
	Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr			
5		245	250	255
	Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu			
		260	265	270
10	Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln			
		275	280	285
15	Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser			
		290	295	300
	Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu			
20		305	310	315
	Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys			
		325	330	335
25	Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu			
		340	345	350
	Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly			
30		355	360	365
	Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala			
		370	375	380
35	Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys			
		385	390	395
	Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met			
40		405	410	415
	Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp			
		420	425	430
45	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala			
		435	440	445
50	Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu			
		450	455	460
	Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr			
55		465	470	475
				480

ES 2 291 219 T3

	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr
							485				490					495
5	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	Gln
				500					505					510		
	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Ser	His	Ala	Gly	Asn	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	Ala
10				515					520					525		
	Val	Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Asp	Asn	Ala
				530					535					540		
15	Lys	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	Lys
	545						550					555			560	
	Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Lys	Asn	Trp	Ala	Thr
20							565				570				575	
	Thr	Tyr	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys
25				580					585					590		
	Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Ser	Asp	Asp
				595					600					605		
30	Phe	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Glu	Trp	Arg	Glu	His	Met	Trp	Ser	Asp	Val
	610						615							620		
	Ala	Ala	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Lys	Ser
35	625					630					635				640	
	Thr	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Asp	Met	Pro	Leu	Ala
				645							650				655	
40	Lys	Met	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Thr	Asn	Val	Val	Ala	Ser	Lys	Glu	Leu
				660					665					670		
	Gln	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala	Arg	Ser	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu
45				675					680					685		
	Pro	Lys	Glu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asp	His	Leu	Gly	Val	Ile	Pro
50				690					695					700		
	Arg	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Phe	Gly	Leu
	705					710					715				720	
55	Asp	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	Ala

ES 2 291 219 T3

	725	730	735
	His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr		
5	740	745	750
	Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala		
	755	760	765
10	Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu		
	770	775	780
	Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met		
15	785	790	795
	Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu		
	805	810	815
20	Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser		
	820	825	830
	Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val		
25	835	840	845
	Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala		
	850	855	860
30	Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe		
	865	870	875
	Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr		
35	885	890	895
	Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly		
40	900	905	910
	Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly		
	915	920	925
45	Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu		
	930	935	940
	Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu		
50	945	950	955
	His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln		
55	965	970	975

ES 2 291 219 T3

His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln
980 985 990
Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala
995 1000 1005
Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser
1010 1015 1020
Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg
1025 1030 1035 1040
Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly
1045

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP
 <400> 3

gcaggagacg ggttgnnnac aagctggacg

30

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP
 <400> 4

cgtccagctt gtnnncaacc cgtctcctgc

30

<210> 5
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP
 <400> 5

gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaat ccag

34

<210> 6
 <211> 34

ES 2 291 219 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
	<400> 6	
10	ctggattgc tcgctgnnnc ttgtcattg ctc	34
	<210> 7	
	<211> 41	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
	<400> 7	
25	gcttgataa aaacttaaag tcaannnctt aaattgtac g	41
	<210> 8	
	<211> 40	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
35	<400> 8	
	cgtaaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc	40
40	<210> 9	
	<211> 37	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
50	<400> 9	
	gttattaaac acagataaan nngtcaagc ttgatg	37
55	<210> 10	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
65	<400> 10	
	catcaaagct tgaacnnntt tatctgtgtt taataac	37

ES 2 291 219 T3

	<210> 11	
	<211> 37	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
10	<400> 11	
	gttattaaac acagataaac cgnnncaagc ttgatg	37
15	<210> 12	
	<211> 37	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
25	<400> 12	
	catcaaagct tgnnncggtt tatctgtgtt taataac	37
30	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
40	<400> 13	
	cgaggcgcct ggtnnngtaa cgcgctactt atc	33
45	<210> 14	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
55	<400> 14	
	gataagtagc gcgttacnnn accaggcgcc tcg	33
60	<210> 15	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	

ES 2 291 219 T3

	<400> 15	
	cctggtcgtg taacgcgcnn nttatcaagt cagc	34
5	<210> 16	
	<211> 34	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
15	<400> 16	
	gctgacttga taannngcgc gttacacgac cagg	34
20	<210> 17	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
30	<400> 17	
	gctttgataa aaacttannn caagcgctta aattgtacg	40
35	<210> 18	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
	<400> 18	
45	cgtacaaatt taagcgcttg nnntaagttt ttatcaaagc	40
	<210> 19	
50	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP	
	<400> 19	
60	ggcgacgaac tannngttct gattcctcag	30
	<210> 20	
	<211> 30	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 291 219 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial de: cebador RCP

5 <400> 20

ctgaggaatc agaacnnnta gttcgtgcc

30

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65