



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 149**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04717856 .1**
96 Fecha de presentación : **05.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1602722**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Procedimiento para producir transglutaminasa microbiana.**

30 Prioridad: **07.03.2003 JP 2003-61623**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.04.2011

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

72 Inventor/es: **Umezawa, Yukiko;**
Yokoyama, Keiichi;
Kikuchi, Yoshimi;
Date, Masayo y
Onishi, Norimasa

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 356 149 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

Campo del invento

El presente invento se refiere a una nueva proteasa que escinde eficazmente la parte proestructural de una protransglutaminasa para convertir ésta en una transglutaminasa en forma activa, y a un ácido nucleico que la codifica, siendo
5 producida dicha protransglutaminasa por actinomicetos.

El presente invento también se refiere a un método para producir transglutaminasa microbiana en su forma activa usando dicha proteasa. Además, el presente invento se refiere a un método para producir la metaloproteasa neutra.

10 Fundamento del invento

La transglutaminasa es una enzima que cataliza la reacción de transferencia acílica de grupos γ -carboxilamida en la cadena peptídica de la proteína. Cuando se hace reaccionar la enzima con una proteína, puede tener lugar la formación del enlace cruzado ϵ - (γ - Glu) - Lys y la sustitución de Gln por Glu mediante desamidación. Se han usado transglutaminasas para fabricar productos alimenticios gelificados, tales como gelatinas, yogures y quesos, productos cosméticos gelificados y otros, y para mejorar la calidad de la carne, etc. [publicación japonesa de solicitud examinada (JP-Kokoku) nº 1-50382]. Además, la transglutaminasa es una enzima que tiene una gran utilidad industrial ya que ha sido usada para fabricar materiales para microcápsulas termoestables, soportes para enzimas inmovilizadas, etc.
15 20

Se han conocido previamente transglutaminasas de animales, que son dependientes del calcio para expresar sus actividades, y transglutaminasas de microorganismos [transglutaminasa(s) microbiana(s), a la/las que también se hace/hacen referencia más adelante como "MTG(s)" (del inglés, microbial transglutaminase(s)), que son independientes del calcio para expresar sus actividades. En cuanto a la MTG, se ha descubierto una transglutaminasa de una bacteria que pertenece al género *Streptovercillium*. Dichas bacterias *Streptovercillium* incluyen, por ejemplo, *Streptovercillium griseocarneum* IFO 12776, *Streptovercillium cinnamoneum* subespecie *cinnamoneum* IFO 12852, *Streptovercillium mobaraense* (que en adelante puede ser abreviada *S. mobaraense*) IFO 13819 y otras [publicación de solicitud de patente japonesa no examinada (JP-Kokai) nº 64-27471].
25 30

Sin embargo, puesto que estas transglutaminasas han sido producidas por medio de la purificación de cultivos, tales como los de los microorganismos anteriormente descritos, ha habido problemas en cuanto a la cantidad, la eficacia y similares. Entonces, como un método para hacer que se secretaran eficazmente proteínas
35

heterólogas, se estableció el método por el que se seleccionaba una bacteria corineforme como huésped, una proteína fusionada que tenía transglutaminasa conectada a una cadena abajo con el dominio del péptido señal de una bacteria corineforme, y la transglutaminasa resultaba eficazmente secretada para obtener una gran producción de transglutaminasa (WO 01/23591). En este estudio, se describe un método por el que una MTG es secretada en una forma inactiva como una protransglutaminasa (a la que más adelante se hace referencia como "pro-MTG") en que una parte proestructural está conectada con la MTG, y la parte proestructural de la pro-MTG es luego escindida por una proteasa para convertirla en una transglutaminasa que tiene actividad, así como un método por el que se produce directamente una transglutaminasa activa en el medio de cultivo por coexpresión de SAM-P45, que es una serina proteasa procedente de actinomicetos, en una cantidad necesaria y suficiente en una bacteria corineforme que produce la pro-MTG.

Aunque se supone que un método por el que se produce directamente una transglutaminasa activa por coexpresión de pro-MTG y una proteasa que permite escindir la parte proestructural de la pro-MTG en una bacteria corineforme es un método muy eficaz para producir transglutaminasa, la especificidad de sustrato de SAM-P45 no es tan estricta y puede digerir y degradar no sólo la parte proestructural de la pro-TMG sino también la propia transglutaminasa en cierto grado; por lo tanto, puede que el manejo de SAM-P45 no sea sencillo. Por lo tanto, en los casos en que se utiliza SAM-P45, el método de producción de transglutaminasa debería ser estrictamente controlado para que no tuviera lugar en el medio de cultivo la descomposición de la transglutaminasa producida,

Por lo tanto, queda aún la exigencia de una proteasa que pueda escindir selectivamente sólo la parte proestructural de la pro-MTG y que cause una sobredescomposición lo más pequeña posible de la propia transglutaminasa, para llevar a cabo ventajosamente la producción de una transglutaminasa en forma activa.

Como una enzima que escinde la parte proestructural de la pro-MTG, además de SAM-P45, se conoce una dispsa procedente de *Bacillus polymyxa* [Eur. J. Biochem., volumen 257, páginas 570-576 (1998)]. Sin embargo, se requiere una gran cantidad de enzimas para la escisión de la parte proestructural y existe el riesgo de la sobredescomposición de la propia transglutaminasa. Además, una dispsa es un reactivo para cultivo celular, por lo que es costosa como enzima para uso industrial.

Sumario del invento

Como se mencionó anteriormente, queda aún la necesidad de una proteasa que pueda escindir selectivamente sólo la parte proestructural de la pro-MTG y que cause una sobredescomposición lo más pequeña posible de la propia transglutaminasa para llevar a cabo ventajosamente la producción de una transglutaminasa en forma activa. Además, se creyó que, si se pudieran usar proteasas que pudieran escindir selectivamente sólo la parte proestructural de la pro-MTG y que causaran una sobredescomposición lo más pequeña posible de la propia transglutaminasa, esto sería ventajoso para la producción de una transglutaminasa activa. Además, se creyó que, si las proteasas útiles para la producción de transglutaminasa que pueden escindir selectivamente la parte proestructural de la pro-MTG fueran aquéllas que pueden ser secretadas extracelularmente, esto sería más preferible porque las transglutaminasas activas podrían ser directamente producidas en el medio de cultivo haciendo que se coexpresaran junto con la pro-MTG.

Por lo tanto, un objeto del presente invento es proporcionar una proteasa que sea útil para la producción de transglutaminasa y que escinda selectivamente la parte proestructural de la pro-MTG.

En particular, un objeto del invento es proporcionar una proteasa que escinda selectivamente la parte proestructural de la pro-MTG, proteasa que puede ser producida utilizando una bacteria corineforme como huésped, y que pueda ser fácilmente secretada extracelularmente.

Un objeto del invento es también proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifique dicha proteasa.

Otro objeto del invento es proporcionar un método para producir eficazmente MTG utilizando dicha proteasa.

Además, un objeto del invento es proporcionar un método para producir dicha proteasa.

Los inventores del presente invento buscaban una proteasa que escindiera selectivamente la parte proestructural de la pro-MTG pero que causara la menor descomposición posible de la propia transglutaminasa, y más adelante pudieron aislar y purificar una metaloproteasa neutra que tenía dicha propiedad. Los inventores también obtuvieron un DNA que codificaba dicha proteasa, lo introdujeron en una bacteria corineforme, y luego tuvieron éxito en su expresión secretora al utilizar una bacteria corineforme como huésped. Además, la presente enzima fue hecha reaccionar realmente sobre la pro-MTG para escindir la parte proestructural y luego se recuperó la

transglutaminasa activa. Los inventores establecieron el presente invento al identificar metaloproteasas neutras procedentes de microorganismos de otras fuentes que tenían una función equivalente, que han demostrado ser similarmente útiles para la producción de una MTG activa.

5 Es decir, el presente invento es una metaloproteasa neutra de actinomicetos que presenta una elevada selectividad para escindir la parte proestructural de la pro-MTG, y una molécula de ácido nucleico que la codifica.

El presente invento es también un método para producir una MTG activa, que comprende escindir una parte proestructural de una pro-MTG mediante una metaloproteasa neutra.

10 El presente invento es también un método para producir dicha metaloproteasa, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico que codifica dicha metaloproteasa neutra en una bacteria corineforme, cultivar la bacteria corineforme en que se ha introducido dicha molécula de ácido nucleico, permitiendo por ello la expresión de dicha metaloproteasa neutra, y recuperar dicha metaloproteasa extracelularmente secretada.

Más específicamente, el presente invento es una metaloproteasa neutra SVP35 procedente de actinomicetos que tiene las propiedades siguientes:

- 1) Peso molecular: aproximadamente 35.000 (según se mide por SDS-PAGE)
- 20 2) pH óptimo: 6,0-8,0, más específicamente 6,5-7,5, en particular alrededor de 7,0
- 3) Estabilidad frente al pH: pH de 4-10
- 4) Temperatura óptima: aproximadamente 45 °C
- 5) Estabilidad frente a la temperatura: es estable por debajo de aproximadamente 50 °C
- 25 6) Resulta fuertemente inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenantrolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, y por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI; del inglés, *Streptomyces subtilisin inhibitor*) procedente de actinomicetos.

El presente invento es también una metaloproteasa neutra SVP70 que tiene las propiedades siguientes:

- 1) Peso molecular: aproximadamente 71.000 (según se mide por SDS-PAGE)
- 2) pH óptimo: el intervalo 6,0-8,0, más específicamente 6,5-7,5, en particular alrededor de 7,0
- 3) Estabilidad frente al pH: pH de 5-10
- 35 4) Temperatura óptima: el intervalo de aproximadamente 50-55 °C, en particular alre-

dedor de 55 °C

5) Experimenta una intensa acción inhibitoria por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenantrolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, el ditioneitol, que es un agente reductor de enlaces disulfuro, y por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos.

El presente invento es también una molécula de ácido nucleico que codifica dicha SVP35 o SVP70.

El presente invento es también un método para producir una MTG activa, que comprende escindir la parte proestructural de la pro-MTG mediante dicha SVP35 o SVP70.

Además, el presente invento es un método para producir SVP35 o SVP70, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico que codifica dicha SVP35 o SVP70 en una bacteria corineforme, cultivar la bacteria corineforme en que se ha introducido dicha molécula de ácido nucleico, y recuperar la SVP35 o SVP70 extracelularmente secretada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que presenta la dependencia de la actividad de SVP35 y SVP70 frente al pH.

La Figura 2 es un gráfico que presenta la estabilidad de SVP35 y SVP70 frente al pH.

La Figura 3 es un gráfico que presenta la dependencia de la actividad de SVP35 y SVP70 frente a la temperatura.

La Figura 4 es un gráfico que presenta la estabilidad de SVP35 frente a la temperatura.

La Figura 5 representa las actividades inhibitorias de diversos compuestos sobre las actividades de SVP35 y SVP70.

La Figura 6 representa el cambio secuencial de la conversión de pro-MTG en una forma activa de MTG por SVP35 y SVP70, como cambio respectivo de la cantidad de la proteína.

Las Figura 7 (A) y (B) son los gráficos que representan el curso temporal de la actividad transglutaminasa si se hace reaccionar una pro-MTG con SVP70 y SAM-P45, respectivamente. (A): adición de SVP70, ●: cantidad de adición de 1/200 con respecto al sustrato, ■: cantidad de adición de 1/500 con respecto al sustrato; (B): adición de SAM-P45, ▲: cantidad de adición de 1/10 con respecto al sustrato, ◆: cantidad de adición de 1/50 con respecto al sustrato.

Las Figura 8 (A) y (B) son los gráficos que representan el curso temporal de la cantidad de proteína MTG si se hace reaccionar una pro-MTG con SVP70 y SAM-P45, respectivamente. (A): adición de SVP70, ●: cantidad de adición de 1/200 con respecto al sustrato, ■: cantidad de adición de 1/500 con respecto al sustrato; (B): adición de SAM-P45, ▲: cantidad de adición de 1/10 con respecto al sustrato, ◆: cantidad de adición de 1/50 con respecto al sustrato.

Descripción de las realizaciones preferidas

En general, se ha sabido que una proteína secretora es traducida como un prepéptido o un prepropéptido y, más tarde, su péptido señal ("una preparte") es escindido para convertirse en un péptido o propéptido maduro, y el propéptido es escindido en el dominio al que se hace referencia como proestructura para ser un péptido maduro. Como aquí se utiliza, a una parte proestructural de una proteína secretora se puede hacer simplemente referencia como "proestructura". Además, como aquí se utiliza, "una secuencia señal" se refiere a la secuencia que está situada en el extremo N de un precursor de proteína secretora y que no está presente en una proteína madura presente en la naturaleza, y "un péptido señal" se refiere al péptido que se escinde de dicho precursor proteico. Generalmente, una secuencia señal es escindida por una proteasa después de la secreción extracelular.

Como aquí se usa, a una proteína que no contiene un péptido señal pero contiene una parte proestructural se puede hacer referencia como "proproteína", tal como, por ejemplo, "protransglutaminasa" o "pro-MTG". Como aquí se usa, a una parte proestructural de una proteína secretora se puede hacer simplemente referencia como "una proestructura" o "una parte proestructural", y estas expresiones se pueden utilizar aquí indistintamente.

Entre las proteasas que supuestamente son capaces de expresarse fácilmente en una bacteria corineforme, los inventores llevaron primero a cabo la búsqueda de una proteasa que tuviera una especificidad y una selectividad elevadas para el sustrato de interés, es decir, una proteasa que escindiera selectivamente la parte proestructural de una pro-MTG y causara una sobredescomposición lo más pequeña posible de la propia transglutaminasa.

Cuando la MTG es secretada extracelularmente por un actinomiceto, se ha supuesto que es primero secretada como una pro-MTG, lo que va seguido de la escisión de la parte proestructural de la pro-MTG para dar lugar a una forma activa de MTG [Eur. J. Biochem., volumen 257, páginas 570-576 (1998)]. En consecuencia, los inventores han supuesto que una proteasa que escinde la parte proestructural de una

pro-MTG está presente en los actinomicetos que producen MTG. Puesto que esta proteasa es originalmente una proteasa que escinde la parte proestructural, se supone que la proteasa tiene una elevada selectividad por los sustratos y sólo escinde la parte proestructural mientras actúa en menor grado sobre la propia MTG.

5 Además, en una bacteria corineforme se pueden expresar eficazmente tanto un gen estructural de una pro-MTG de actinomicetos como un gen estructural de la proteasa SAM-P45, y se pueden secretar extracelularmente. Basándose en esta información, se ha realizado una seria investigación con objeto de hallar la proteasa de interés a partir de una bacteria productora de MTG que es un actinomiceto, y, como resultado, se reveló que la cepa de *Streptovercillium mobaraense* productora de MTG
10 tenía una elevada selectividad de escisión por la parte proestructural de la pro-MTG y produce nuevas metaloproteasas neutras útiles para la producción de una MTG activa. Los presentes inventores aislaron y purificaron estas metaloproteasas neutras y demostraron sus propiedades enzimológicas. Además, los inventores determinaron las
15 secuencias de aminoácidos de las partes N-terminales de estas metaloproteasas y obtuvieron los genes que codifican las metaloproteasas.

 Además, los inventores introdujeron el gen de la enzima en una bacteria corineforme, permitiendo su expresión en un sistema utilizando una bacteria corineforme como huésped, y, como resultado, la enzima era secretada extracelularmente.
20 Además, en la práctica, se hacía reaccionar la enzima sobre una pro-MTG de una parte proestructural, lo que daba lugar a la escisión de la parte proestructural para producir una transglutaminasa activa. También se han hallado metaloproteasas neutras de microorganismos de otras fuentes que tienen una función equivalente, que han demostrado ser similarmente útiles para la producción de una forma activa de MTG.

25 Más adelante se ilustrarán las realizaciones más específicas del presente invento.

 Las metaloproteasas neutras de acuerdo con el presente invento pueden ser preparadas a partir de las superficies de actinomicetos en cultivo o del sobrenadante del cultivo de los actinomicetos, incluyendo *Streptovercillium mobaraense*,
30 *Streptomyces griseus*, *Streptomyces coelicolor*, etc.

 En la parte siguiente se describen primero las recién halladas metaloproteasas neutras de *Streptovercillium mobaraense* IFO13819.

 El cultivo de una bacteria para obtener la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento, por ejemplo, un actinomiceto anteriormente descrito,
35 puede ser llevado a cabo de acuerdo con los métodos convencionalmente utilizados

para el cultivo de actinomicetos. Es decir, como medio para el cultivo, se puede utilizar un medio común que contiene convencionales fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, iones inorgánicos y otros. Como fuentes de carbono se pueden utilizar glucosa, almidón, sacarosa y otros. Como fuentes de nitrógeno, si fueran necesarias, se usan 5 opcionalmente peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, sal de amonio y otros. El cultivo puede ser llevado a cabo bajo el estado aeróbico que es apropiadamente controlado dentro del intervalo de pHs de entre 5,0 y 8,5 y el intervalo de temperaturas de entre 15 °C y 37 °C. Para la producción de las metaloproteasas 10 neutras de acuerdo con el presente invento, el cultivo es preferiblemente continuado hasta que se puede alcanzar la máxima cantidad de la metaloproteasa neutra pretendida y luego puede ser terminado. Aunque el periodo de cultivo adecuado depende de la temperatura, el pH y el tipo de medio, normalmente el periodo es preferiblemente de aproximadamente 1 a 12 días. Después del periodo de cultivo, se puede someter el cultivo a la separación de las células y el sobrenadante por centrifugación y similares.

15 Las nuevas metaloproteasas neutras de acuerdo con el presente invento se pueden obtener del sobrenadante del cultivo así como de las células recuperadas, en particular de la superficie de las células. Para purificar la enzima, se pueden adoptar cualesquier métodos que se usan convencionalmente para purificar una enzima, tales como, por ejemplo, la técnica de precipitación por adición de sulfato amónico, 20 la técnica de filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrófoba y similares. La proteasa puede ser purificada más eficazmente usando cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography), etc. La medición de la actividad enzimática de la metaloproteasa neutra obtenida de este modo puede ser llevada a cabo haciendo reaccionar la enzima 25 con un péptido que contiene una región que conecta la proparte de una protransglutaminasa y una transglutaminasa madura, tal como, por ejemplo, el péptido sintético Gly-Pro-Ser-Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser (ID. SEC. n° 11) (Peptide Institute), como sustrato y calculando la cantidad reducida del sustrato.

Como se mencionó anteriormente, la metaloproteasa neutra de acuerdo 30 con el invento, purificada a partir de las células recuperadas, en particular de la superficie de las células, o a partir del sobrenadante del cultivo, puede ser analizada en cuanto a la secuencia de aminoácidos N-terminal mediante un secuenciador de proteínas en fase gaseosa para determinar la secuencia parcial de aminoácidos. Además, se pueden examinar las propiedades enzimáticas (pH óptimo, estabilidad frente al pH, 35 temperatura óptima, efecto de un inhibidor, etc.) de la metaloproteasa neutra aislada y

purificada.

En una realización del presente invento, la metaloproteasa neutra denominada SVP35 fue obtenida de la superficie de las células de *Streptovercillium mobaraense*, y la metaloproteasa neutra denominada SVP70 puede ser obtenida del sobrenadante del cultivo de *Streptovercillium mobaraense*.

En una realización del presente invento, la metaloproteasa neutra de acuerdo con el invento es la metaloproteasa neutra SVP35 que tiene las propiedades siguientes:

- 1) Peso molecular: aproximadamente 35.000 (según se mide por SDS-PAGE)
- 2) pH óptimo: 6,0-8,0, más específicamente 6,5-7,5, en particular alrededor de 7,0
- 3) Estabilidad frente al pH: pH de 4-10
- 4) Temperatura óptima: aproximadamente 45 °C
- 5) Estabilidad frente a la temperatura: es estable por debajo de aproximadamente 50 °C
- 6) Inhibidores: Resulta fuertemente inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenantrolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, y por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos.

En otra realización del presente invento, la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento es la metaloproteasa neutra SVP70 que tiene las propiedades siguientes:

- 1) Peso molecular: aproximadamente 71.000 (según se mide por SDS-PAGE)
- 2) pH óptimo: 6,0-8,0, más específicamente 6,5-7,5, en particular alrededor de 7,0
- 3) Estabilidad frente al pH: pH de 5-10
- 4) Temperatura óptima: aproximadamente 50-55 °C, en particular alrededor de 55 °C
- 5) Inhibidores: Resulta fuertemente inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenantrolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, el ditioneitol, que es un agente reductor de enlaces disulfuro, y por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos.

Cuando se hace reaccionar SVP35 o SVP70 sobre pro-MTG, ambas muestran una elevada actividad de escisión selectiva sobre la parte proestructural de la MTG. Es decir, puesto que ambas enzimas se caracterizan por convertir eficazmente la pro-MTG en la MTG activa, aunque la actividad para degradar la propia MTG activa resultante es baja, ambas son las enzimas adecuadas para producir una MTG activa utilizando pro-MTG como materia prima. Las secuencias de aminoácidos N-terminales de las dos nuevas metaloproteasas neutras se muestran en la ID. SEC. nº 1

para SVP35 y la ID. SEC. n° 2 para SVP70, que revelan la homología entre estas secuencias. Por lo tanto, se buscaron aquellas enzimas que tuvieran cualquier homología con estas proteasas en cuanto a sus secuencias de aminoácidos N-terminales y se hallaron una metaloproteasa SGMP II [J. Biochem., volumen 110, páginas 339-344 (1991)] de *Streptomyces griseus* así como las tres metaloproteasas (GenBank/EMBL/DDBJ CAB76000, CAB76001, CAB69762) de *Streptomyces coelicolor* y similares. Estas proteasas pueden ser también utilizadas del mismo modo que SVP35 y SVP70 para la escisión selectiva de la parte proestructural de una pro-MTG y pueden ser usadas con objeto de producir una MTG activa utilizando una pro-MTG como materia prima.

A continuación se describirá un método para producir la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento mediante una técnica de DNA recombinante.

Se conocen diversos ejemplos de la producción de proteínas útiles, incluyendo enzimas, sustancias fisiológicamente activas y similares, utilizando la técnica de DNA recombinante. La ventaja de utilizar la técnica de DNA recombinante es la capacidad de producción masiva de proteínas útiles que existen en cantidades mínimas en la naturaleza.

Para producir la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento utilizando la técnica de DNA recombinante, se genera primero una construcción genética, construcción genética que contiene un promotor, una secuencia que codifica un péptido señal apropiado, un fragmento de ácido nucleico que codifica la metaloproteasa neutra de acuerdo con el invento, y una secuencia reguladora (un operador o terminador, etc.) que es necesaria para que se exprese el gen de la metaloproteasa neutra en una bacteria corineforme, en una posición apropiada para que puedan actuar. La metaloproteasa neutra de acuerdo con el invento puede tener una parte proestructural en el extremo N. Los vectores que se pueden utilizar para esta construcción no están particularmente limitados e incluyen cualquiera que pueda actuar en una bacteria corineforme, y pueden ser aquellos que se replican autónomamente, tales como plásmidos, o aquellos que se integran en el cromosoma de la bacteria. Cuando se usa una bacteria corineforme como huésped, los plásmidos procedentes de bacterias corineformes son particularmente preferibles como vectores. Estos incluyen, por ejemplo, pHM1519 [Agric. Biol. Chem. 48, 2901-2903 (1984)], pAM330 [Agric. Biol. Chem. 48, 2901-2903 (1984)] y plásmidos modificados, que poseen genes de resistencia a fármacos.

Los ejemplos de la corinebacteria que se puede utilizar como bacteria huésped en el presente invento incluyen cepas mutantes procedentes de cepas de tipo silvestre, incluyendo *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066, *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13869, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC14067, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium liliium* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC15990, *Brevibacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium ammoniagenes*) ATCC6871 y similares, y cepas mutantes procedentes de cepas mutantes de estos tipos silvestres.

La cepas mutantes que se utilizan en el presente invento incluyen, por ejemplo, cepas mutantes defectuosas en cuanto a la capacidad para producir glutamato, cepas mutantes en cuanto a la producción de aminoácidos tales como lisina y similares, y cepas mutantes modificadas para que produzcan otras sustancias tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, inosina. Dichas cepas mutantes se pueden obtener llevando a cabo un tratamiento con radiación ultravioleta o un agente mutágeno químico, tal como N-metil-N'-nitrosoguanidina o similares, y seleccionando luego las cepas en que ha aumentado la capacidad para secretar-producir proteínas.

Especialmente, se supone que *Corynebacterium glutamicum* AJ1203 (FERM BP-734) (el depósito original fue el 26 de Marzo de 1984; actualmente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón), que se ha aislado de la *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) ATCC13869 de tipo silvestre como una cepa mutante resistente a la estreptomycin, tiene una mutación en un gen funcional asociado con la secreción de proteínas, y su capacidad para secretar-producir proteínas heterólogas es tan elevada como aproximadamente 2 ó 3 veces, como una cantidad acumulada, la de su cepa parental (cepa silvestre) bajo la condición de cultivo óptima, por lo que es adecuada como una bacteria huésped (véase el Documento WO 02/081694). Además, es preferible utilizar una cepa que haya sido obtenida modificando dicha cepa como un huésped para que la cepa ya no produzca la proteína de la superficie celular, porque la purificación de las proteínas heterólogas secretadas al medio resultará más sencilla, por lo que es particularmente preferible. Dicha modificación puede ser llevada a cabo, por medio de técnicas de mutagénesis o de recombinación génica, introduciendo una mutación en el gen cromosómico de la proteína de la superficie celular o en su región reguladora de la

expresión.

Los ejemplos de promotores de una bacteria corineforme incluyen promotores para los genes de las proteínas PS1, PS2 y SlpA de la superficie celular, promotores para los genes en sistemas biosintéticos de diversos aminoácidos, tales como, por ejemplo, el gen de la glutamina sintetasa, el gen de la aspartocinasa en el sistema biosintético de la lisina y similares.

El péptido señal que se utiliza en el presente invento es el péptido señal de una proteína secretora de una bacteria corineforme, el huésped, y es preferiblemente el péptido señal de una proteína de la superficie celular de una bacteria corineforme. Las proteínas de la superficie celular de las bacterias corineformes incluyen PS1 y PS2 de *C. glutamicum* (JP-Kokai nº 6-502548) y SlpA de *C. ammoniagenes* (JP-Kokai nº 10-108675).

Para producir una metaloproteasa neutra cuya actividad relativa a la escisión selectiva de una proestructura de una pro-MTG sea elevada utilizando la técnica de DNA recombinante, se necesita un DNA que codifique dicha metaloproteasa neutra.

En una realización del presente invento, se produce la metaloproteasa neutra SVP35 utilizando la técnica de DNA recombinante. El DNA que codifica SVP35 puede ser obtenido del modo siguiente.

En primer lugar, se determina la secuencia de aminoácidos de la SVP35 purificada. Se puede usar el método de Edman [P. Edman, Acta Chem. Scand. 4, 227 (1950)] para determinar la secuencia de aminoácidos. También se pueden utilizar un secuenciador de proteínas en fase gaseosa, de Shimadzu Co. Ltd., y similares para determinar la secuencia de aminoácidos.

Para la metaloproteasa neutra SVP35 de acuerdo con el presente invento, se ha hallado la secuencia mostrada en la ID. SEC. nº 1 secuenciando 20 restos de aminoácido de su extremo N.

Esta información puede ser usada para sintetizar un cebador apropiado para PCR y generar una sonda para obtener la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento. Por ejemplo, un gen de proteasa de actinomicetos, del que se supone que tiene una homología basándose en los resultados de la búsqueda de homologías en la secuencia de aminoácidos N-terminal, por ejemplo, un gen de metaloproteasa (GenBank/EMBL/DDBJ CAB76001) de *Streptomyces coelicolor*, puede ser sometido a una PCR utilizando como molde un DNA de actinomicetos preparado mediante el método de Saito y Miura [Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)], para multi-

plicar el fragmento del gen que codifica esta proteasa. El fragmento multiplicado puede ser utilizado como una sonda.

A continuación, el DNA de actinomicetos preparado mediante el método de Saito y Miura, por ejemplo, el DNA cromosómico de *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819, es digerido con diferentes enzimas de restricción apropiadas, por ejemplo, con diversas enzimas de restricción que reconocen secuencias de 6 bases. El DNA cromosómico de actinomicetos digerido puede ser analizado mediante las técnicas bien conocidas por los expertos en este campo técnico, tales como la técnica de hibridación por transferencia Southern descrita en "Molecular Cloning", 2ª edición [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, página 9.31 (1989)], y similares, usando el producto de PCR obtenido mediante la PCR anteriormente descrita, marcado con ³²P. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento o la parte de la misma puede ser clonada recuperando el fragmento del que se ha confirmado por transferencia Southern que tiene una elevada homología con la sonda utilizada y clonándolo en un vector apropiado. Las técnicas necesarias para dicha clonación génica son bien conocidas por los expertos en este campo técnico [véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, página 1.90 (1989)].

En una realización del presente invento, se lleva a cabo una PCR utilizando el DNA cromosómico de *Streptomyces coelicolor* A3(2) como molde para producir una sonda. Además, se detecta una sola banda de aproximadamente 8 kb, hibridable con sondas marcadas con ³²P, en el producto de digestión del DNA cromosómico de *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819 digerido con SphI. De esta manera, se digiere con SphI el DNA cromosómico de *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819 preparado mediante el método precedente, se recupera el fragmento de aproximadamente 8 kb por medio de una electroforesis en gel de agarosa, se introduce el fragmento recuperado en el sitio SphI de pUC18 y luego se introduce en una célula competente de *Escherichia coli* JM109 para generar un banco. Se pueden obtener los clones de interés explorando el banco generado, utilizando un oligonucleótido sintético como sonda de acuerdo con las técnicas de hibridación de colonias descritas en "Molecular Cloning", 2ª edición (*supra*), y seleccionando la cepa que porta el plásmido que contiene el fragmento génico de SVP35 clonado en el plásmido. El plásmido recuperado de esta cepa es aquí denominado pVSV1. Se analiza la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado en pVSV1 y se deduce la secuencia de aminoácidos primaria para confirmar que el fragmento codifica la secuencia de aminoácidos N-terminal pre-

viamente determinada. De este modo, se confirma que el gen obtenido es el gen que codifica SVP35.

Luego se puede construir una molécula de ácido nucleico recombinante que exprese la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento al ligar una construcción genética que contiene el DNA que codifica la metaloproteasa obtenida, con un vector apropiado que depende de las propiedades del huésped utilizado. Las células huésped de bacteria corineforme son transformadas con la molécula de ácido nucleico recombinante. Las células transformadas pueden ser cultivadas en un medio adecuado para recuperar la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento, secretada o acumulada en el medio y/o en la célula.

A continuación, se describirá un método para producir una MTG activa a partir de pro-MTG utilizando la metaloproteasa neutra.

La metaloproteasa neutra utilizada en la producción de una MTG activa puede ser hecha reaccionar sobre una pro-MTG, como una fracción que contiene la metaloproteasa neutra preparada a partir del medio de cultivo de una bacteria productora de metaloproteasa neutra. También puede ser utilizada como una metaloproteasa neutra más sumamente purificada con elevada actividad específica. Además, como se describe más adelante, también se puede utilizar la metaloproteasa neutra, en que la metaloproteasa neutra puede ser obtenida al cultivar la célula transformada con una molécula de ácido nucleico recombinante que se puede obtener al conectar un DNA que codifica una metaloproteasa neutra que tiene una intensa actividad de escisión selectiva hacia una parte proestructural de una pro-MTG.

La pro-MTG utilizada para la producción de MTG puede ser una fracción que contenga la pro-MTG preparada a partir del medio de cultivo de una bacteria productora de pro-MTG. También se puede usar una pro-MTG más sumamente purificada. La reacción se puede llevar a cabo bajo la condición de que la cantidad de una metaloproteasa neutra añadida a la pro-MTG sea de 1/10 a 1/500 en peso y de que se ajusten apropiadamente la temperatura de reacción en el intervalo de entre 15 °C y 50 °C y el pH en el intervalo de entre 5,0 y 9.

Además, la construcción genética, que se construye del modo anteriormente descrito y contiene el DNA que codifica la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento, puede ser introducida en un microorganismo que contiene la construcción genética que codifica una pro-MTG, en particular, en una bacteria corineforme, para producir en una sola célula bacteriana tanto la pro-MTG como la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento, por lo que se puede convertir la

pro-MTG en una MTG madura bajo la condición anterior. En, por ejemplo, el Documento WO 01/123591 se describen un método más detallado para producir eficazmente una pro-MTG en células corineformes, la construcción genética utilizada para dicho método, y una bacteria corineforme en que se introducido la construcción genética.

5 Más específicamente, por ejemplo, se puede obtener una bacteria corineforme que puede secretar extracelular y eficazmente una proteína pro-MTG al introducir una construcción genética en una bacteria corineforme, en que la construcción genética se obtiene al conectar la secuencia que tiene la secuencia que codifica una pro-MTG, que está situada cadena abajo con respecto a la secuencia que codifica el dominio de

10 péptido señal de una bacteria corineforme, particularmente el dominio de péptido señal de una proteína de la superficie celular, cadena abajo con respecto a un promotor apropiado. El péptido señal, el promotor y el huésped que se pueden utilizar para este fin pueden ser seleccionados entre péptidos señal, promotores y huéspedes que son adecuados para que se expresen las metaloproteasas neutras de acuerdo con el presente

15 invento, como se mencionó anteriormente. Los expertos en la técnica también conocen bien una combinación de vectores que son compatibles en la misma célula. Por lo tanto, se puede obtener la MTG madura introduciendo una apropiada construcción para expresión genética que contiene el DNA que codifica la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento, como se mencionó anteriormente, en una bac-

20 teria corineforme que produce una pro-MTG, o viceversa, introduciendo una apropiada construcción para expresión genética que codifica una pro-MTG en una bacteria corineforme que produce la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento, lo que permite que las construcciones genéticas que pueden expresar la pro-MTG y la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento coexistan en la misma bac-

25 teria, cultivando la bacteria y manteniendo el cultivo en una condición apropiada para que la metaloproteasa neutra de acuerdo con el presente invento pueda ser activa.

La transglutaminasa producida mediante el método de acuerdo con el presente invento puede ser aislada y purificada de la mezcla de reacción de acuerdo con los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la trans-

30 glutaminasa puede ser aislada y purificada separando las células de la mezcla por centrifugación, etc., y utilizando luego apropiados métodos conocidos tales como precipitación por adición de sal, precipitación con etanol, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía en fase líquida y presión media-elevada, cromatografía en fase

35 inversa, cromatografía hidrófoba y las combinaciones de los mismos.

El presente invento es adicionalmente descrito en los ejemplos siguientes, los cuales no deben ser considerados en modo alguno como limitación del presente invento.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Metaloproteasa neutra producida por *Streptovercillium mobaraense* IFO13819

(1) Purificación de la metaloproteasa neutra (SVP70) producida por *Streptovercillium mobaraense* IFO13819

Se cargaron 800 ml de medio de cultivo ISP2 (4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta y 4 g de glucosa por litro de agua; pH ajustado a 7,3) en un matraz Sakaguchi (matraz con sacudimiento) de 5 l de capacidad, se inoculó *Streptovercillium mobaraense* IFO13819 procedente de una placa y se cultivó mediante sacudimiento a 30 °C durante 9 días a 120 rpm. Se centrifugó el medio de cultivo y se recogió el sobrenadante del cultivo. Se filtró usando un filtro Depth (tamaño de poro de 3 µm; Sartorius Co, Ltd.), lo que fue seguido de concentración utilizando una membrana Sartocon Slice que tenía un tamaño de poro de 10.000 Da (Sartorius Co. Ltd.). El producto de concentración fue diluido en un orden de magnitud de 10 con tampón de Tris-HCl/cloruro cálcico 5 mM (pH de 7,5), sometido a cromatografía rápida en fase líquida para proteínas (FPLC; del inglés, fast protein liquid chromatography) (Amersham Pharmacia Co. Ltd.) en una columna de DEAE-Sepharose FF (2,6 cm de diámetro x 10 cm; Amersham Pharmacia Co. Ltd.) equilibrada con el mismo tampón, y eluida utilizando un gradiente lineal de concentraciones con cloruro sódico 0-0,5 M. Se recogió una fracción que contenía el ingrediente activo, se sometió a cromatografía en una columna de Phenyl-Sepharose HP (1,6 cm de diámetro x 10 cm; Amersham Pharmacia Co. Ltd.) equilibrada con sulfato amónico 1,5 M/tampón de MES 20 mM/cloruro cálcico 5 mM (pH de 6,0) y se eluyó usando un gradiente lineal de concentraciones con sulfato amónico 1,5-0 M, y se recogió una fracción activa. La fracción activa resultante fue dializada frente a tampón de MES 20 mM/cloruro cálcico 5 mM (pH de 6,0) durante la noche a 4 °C para obtener una disolución de enzima purificada.

30 La medición de la actividad enzimática en cada operación se llevó a cabo del modo siguiente:

La disolución de la enzima fue añadida a un tampón de fosfato sódico 20 mM que contenía el péptido GPSFRAPDS (Peptide Institute) (ID. SEC. nº 11) para obtener un volumen total de líquido de 170 µl y fue dejada reaccionar a 30 °C durante 10 minutos, lo que fue seguido de un calentamiento a 95 °C durante 5 minutos para

que terminara la reacción. Se analizaron 80 µl de esta disolución por HPLC bajo la condición siguiente y se calculó su actividad basándose en la cantidad disminuida del sustrato.

Aparato: sistema HPLC L-6300 (Hitachi Co. Ltd.)

5 Columna: YMC-PACK ODS 120A, 4,6 x 150 mm (YMC)

Eluyente: (A) TFA al 0,1%, (B) acetonitrilo al 80%/TFA al 0,1%

Condición de elución: gradiente lineal de concentraciones con acetonitrilo al 12-16% (durante 15 minutos)

Caudal: 1,0 ml/min

10 Longitud de onda de detección: 220 nm

Bajo esta condición, el péptido GPSFRAPDS resultó eluido con un tiempo de retención de 13 a 14 minutos y el producto degradado FRAPDS resultó eluido con un tiempo de retención de 7,5 a 8,5 minutos.

15 La cantidad de enzima que cataliza la descomposición de un (1) nanomol de pro-MTG en un minuto se definió como una (1) unidad de actividad enzimática.

(2) Purificación de la metaloproteasa neutra (SVP35) producida por *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819

20 Se cargaron 800 ml de medio de cultivo ISP2 en un matraz Sakaguchi de 5 l de capacidad, se inoculó *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819 procedente de una placa y se cultivó mediante sacudimiento a 30 °C durante 48 horas a 120 rpm. Se centrifugó el medio de cultivo y se desechó el sobrenadante del cultivo para recoger las células. Se suspendieron las células en tampón de Tris-HCl 20 mM/cloruro sódico 30 mM (pH de 7,5), se sacudió la suspensión sobre hielo durante 4 horas y
25 luego se recogió el sobrenadante por centrifugación. El sobrenadante obtenido fue filtrado y esterilizado utilizando un filtro Depth (tamaño de poro de 0,22 µm; fabricado por Sartorius Co, Ltd.) y fue luego sometido a FPLC (Amersham Pharmacia Co. Ltd.) en una columna de CM-Sepharose FF (1,6 cm de diámetro x 10 cm; Amersham Pharmacia Co. Ltd.) equilibrada con tampón de Tris-HCl 20 mM (pH de 7,5) que contenía
30 cloruro de calcio 5 mM y cloruro de cinc 0,01 mM, realizándose la elución con el mismo tampón utilizando un gradiente lineal de concentraciones con cloruro sódico 0-0,5 M. Se recogió una fracción que contenía el ingrediente activo y se sometió adicionalmente a cromatografía en una columna de Phenyl-Sepharose HP (1 ml de capacidad, Amersham Pharmacia Co. Ltd.) equilibrada con tampón de Tris-HCl 20 mM que
35 tenía sulfato amónico 1,5 M, cloruro cálcico 5 mM y cloruro de cinc 0,01 mM, realizán-

dose la elución utilizando un gradiente lineal de concentraciones con sulfato amónico 1,5-0 M. Se recogió una fracción activa y se desmineralizó mediante un tampón de Tris-HCl 20 mM (pH de 7,5) que contenía cloruro de calcio 5 mM y cloruro de cinc 0,01 mM, utilizando una columna PD-10 (Amersham Pharmacia), para obtener una disolución de enzima con parte purificada.

Se midió la actividad enzimática en cada operación utilizando el péptido GPSFRAPDS como sustrato del mismo modo que en el punto (1).

(3) Evaluación de las propiedades de la metaloproteasa neutra (SVP35) producida por *Streptovercillium mobaraense* IFO13819

10 i) Especificidad de sustrato

Se usó como sustrato 1 mg/ml de disolución de insulina B y disolución de pro-MTG preparada en tampón de Tris-HCl 20 mM (pH de 7,5) que contenía cloruro de calcio 5 mM y cloruro de cinc 0,01 mM, se añadió una disolución de enzima a la disolución para que reaccionaran a 30 °C durante 2 horas y se separaron luego los fragmentos peptídicos por HPLC bajo la condición siguiente:

Aparato: L-7100/7200/7405/D-7600 (Hitachi Co. Ltd.)

Columna: VYDAC C18, 4,6 mm de diámetro interno x 250 mm (VYDAC)

Eluyente: (A) TFA al 0,1%, (B) acetonitrilo al 80%/TFA al 0,1%

Condición de elución: gradiente lineal de concentraciones con acetonitrilo al 4-44%

20 Caudal: 0,5 ml/min

Longitud de onda de detección: radiación UV de 220 nm

Se analizaron mediante PPSQ-10 (Shimadzu Co. Ltd.) las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos obtenidos, para caracterizar las secuencias de los puntos de escisión para SVP35. Como resultado, se confirmó que el péptido era escindido antes de (en el extremo N de) especialmente Phe, a menudo Leu, a veces Tyr, Trp, Ile y Val, y que la SVP reconocía los aminoácidos aromáticos y aminoácidos hidrófobos con cadenas laterales voluminosas situadas en P' 1 del sitio de escisión.

ii) pH óptimo

30 En un tampón de GTA 0,15 M [tamponado mediante ácido 3,3-dimetilglutámico, tris(hidroximetil)aminometano, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol] con un pH de 3 a 10, se dejó que SVP35 actuara sobre Gly-Pro-Ser-Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser como sustrato a 30 °C durante 10 minutos. Como resultado, se reveló que el pH óptimo para SVP35 era aproximadamente 7,0 y que, cuando se definía la actividad en un pH de 7,0 como el 100%, la SVP35 tenía una actividad de 70% o más en un pH de

6,0-8,0 y una actividad de 80% o más en un pH de 6,5-7,5 (véase la Figura 1).

iii) Estabilidad frente al pH

Se añadieron 40 µl de tampón de GTA 0,15 M para cada valor del pH de 3 a 10 a 10 µl de una disolución de la enzima SVP35 purificada y se dejó la mezcla a 4 °C durante la noche, lo que fue seguido de la adición de un tampón de fosfato sódico 0,1 M (pH de 7,0) para ajustar el volumen del líquido a 400 µl, y se ajustó el pH a 7,0. Se añadió Gly-Pro-Ser-Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser como sustrato a estas disoluciones de enzima y se dejó que transcurriera la reacción en un pH de 7,0 a 30 °C durante 10 minutos. Como resultado, se mostró que SVP35 era estable en el intervalo de pHs de 4 a 10 (cuando la actividad en un pH de 4,0 era definida como el 100%, tenía una actividad de 90% o más en un pH de 4-10) (véase la Figura 2).

iv) Temperatura óptima

Se añadió Gly-Pro-Ser-Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser a la disolución de enzima purificada, diluida con tampón de Tris-HCl 20 mM (pH de 7,5) que contenía cloruro de calcio 5 mM y cloruro de cinc 0,01 mM, y se dejó que transcurriera la reacción en un pH de 7,0 durante 10 minutos a una temperatura de entre 5 °C y 65 °C. Como resultado, se mostró que SVP35 tenía una temperatura óptima de aproximadamente 45 °C y tenía una elevada actividad en el intervalo de 40 °C a 50 °C (tenía una actividad de 80% o más que aquella a 45 °C) (véase la Figura 3).

v) Estabilidad frente a la temperatura

Se añadieron 40 µl de tampón de Tris-HCl 20 mM (pH de 7,5) que contenía cloruro de calcio 5 mM y cloruro de cinc 0,01 mM a 10 µl de la disolución de enzima purificada para un tratamiento a 4 °C o a una temperatura de 30 °C a 70 °C durante 15 minutos, y luego se enfrió la mezcla mediante hielo y se añadieron 250 µl de un tampón de fosfato sódico 20 mM (pH de 7,0). Se añadió Gly-Pro-Ser-Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser como sustrato a esta disolución de enzima y se dejó que transcurriera la reacción a 30 °C durante 5 minutos. Cuando la actividad con el tratamiento a 4 °C fue definida como el 100%, se calculó la actividad restante a cada temperatura. Como resultado, se mostró que SVP35 conservaba el 80% de la actividad a 50 °C pero perdía su actividad a 60 °C (véase la Figura 4).

vi) Inhibidores

Se añadió la disolución de enzima purificada a un tampón de fosfato
 sódico 20 mM (pH de 7,0) que contenía diversos compuestos con la concentración
 mostrada en la Figura 5 y se dejó la mezcla a temperatura ambiental durante 60 minu-
 5 tos. Luego se añadió Gly-Pro-Ser-Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser como sustrato y se dejó
 que transcurriera la reacción durante 10 minutos a 30 °C. Se calculó la actividad relati-
 va al añadir cada compuesto basándose en una actividad de escisión de Gly-Pro-Ser-
 Phe-Arg-Ala-Pro-Asp-Ser de 100% en ausencia de compuestos. Como resultado, se
 10 mostró que SVP35 resultaba fuertemente inhibida por el ácido etilendiaminotetraacéti-
 co, la 1,10-fenantrolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, y
 por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos
 (véase la Figura 5).

(4) Caracterización de las propiedades de la metaloproteasa neutra (SVP70) producida
 por *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819

15 i) Especificidad de sustrato

Se examinó la especificidad de sustrato de una manera similar a la des-
 crita en (3)-i). Como resultado, se reveló que el sustrato era escindido antes de (en el
 lado N-terminal de) especialmente Phe, a menudo Leu, a veces Tyr, Trp, Ile y Val, y
 que SVP70 reconocía los aminoácidos aromáticos y aminoácidos hidrófobos con ca-
 20 denas laterales voluminosas situadas en P' 1 del sitio de escisión.

ii) pH óptimo

Se examinó el pH óptimo de SVP70 de una manera similar a la descrita
 en (3)-ii). Como resultado, se reveló que el pH óptimo para SVP70 era aproxima-
 damente 7,0 y que, si se definía la actividad en un pH de 7,0 como 100%, la SVP70 tenía
 25 una actividad de 90% o más en un pH de 6,0-8,0 y una actividad de 95% o más en un
 pH de 6,5-7,5 (véase la Figura 1).

iii) Estabilidad frente al pH

Se examinó la estabilidad frente al pH de una manera similar a la descri-
 ta en (3)-iii). Como resultado, se mostró que SVP70 era estable en un pH de 5 a 10
 30 pero era menos estable que SVP35 en un pH ligeramente alcalino (véase la Figura 2).
 Específicamente, si la actividad en un pH de 5,0 era definida como 100%, tenía una
 actividad de 90% o más en el intervalo de pHs de 5 a 7 y tenía una actividad de
 aproximadamente 80% o más incluso en el intervalo de pHs de 7 a 10.

iv) Temperatura óptima

Se examinó la temperatura óptima de SVP70 de una manera similar a la descrita en (3)-iv). Como resultado, se mostró que la temperatura óptima de SVP70 estaba en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 55 °C, especialmente alrededor de 55 °C (véase la Figura 3).

v) Inhibidores

Se examinaron las actividades inhibitorias de diversos compuestos sobre SVP70 de una manera análoga a la descrita en (3)-vi). Como resultado, SVP70 experimentó una intensa acción inhibitoria por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenantrolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, y por el agente reductor ditioneitol, la urea y el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos (véase la Figura 5).

(5) Secuenciación de la secuencia de aminoácidos N-terminal de SVP35 y SVP70

Se transfirieron las enzimas purificadas de SVP35 y SVP70, obtenidas en los puntos (1) y (2) anteriores, a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF; del inglés, polyvinilidene-difluoride) usando Membrane Cartridge (Perkin Elmer Co. Ltd.) y se analizó la secuencia de aminoácidos N-terminal utilizando el secuenciador de proteínas en fase gaseosa PPSQ-10 (Shimadzu Co. Ltd.). La secuencia de aminoácidos de SVP35 se muestra en la ID. SEC. nº 1, y la secuencia de aminoácidos de SVP70 se muestra en la ID. SEC. nº 2. Se puede ver una homología en estas secuencias.

En consecuencia, se buscaron aquellas enzimas que tuvieran cualquier homología con estas proteasas en cuanto a sus secuencias de aminoácidos N-terminales y luego se hallaron la metaloproteasa SGMP II [J. Biochem., volumen 110, páginas 339-344 (1991)] de *Streptomyces griseus* y tres metaloproteasas (GenBank/EMBL/DDBJ CAB76000, la misma CAB76001 y la misma CAB69762), etc., de *Streptomyces coelicolor*. Estas proteasas pueden ser también utilizadas para escindir selectivamente la parte proestructural de la pro-MTG y, por lo tanto, pueden ser usadas para producir una forma activa de MTG de acuerdo con el presente invento.

(6) Clonación del gen SVP35 y su expresión secretora en bacterias corineformes

Se preparó el DNA cromosómico de *Streptomyces coelicolor* A3(2) utilizando el método de Saito y Miura [Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)]. Se sintetizaron los cebadores mostrados en la ID. SEC. nº 3 y la ID. SEC. nº 4 por referencia a la secuencia del gen de metaloproteasa (GenBank/EMBL/DDBJ CAB76001) de *Streptomyces coelicolor*, que tienen una homología en la secuencia de aminoácidos N-ter-

minal. Se usaron los cebadores mostrados en la ID. SEC. nº 3 y la ID. SEC. nº 4 para llevar a cabo una PCR utilizando el DNA cromosómico de *Streptomyces coelicolor* A3(2) como molde, y se multiplicó la región génica del gen de la metaloproteasa. Para la reacción PCR, se usó la DNA polimerasa Pyrobest (Takarasyuzo Co. Ltd.), y la condición de reacción siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Se digirió el DNA cromosómico de *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819, preparado mediante el método de Saito y Miura, con diversas enzimas de restricción que reconocen secuencias de 6 bases, se analizaron las muestras digeridas mediante una hibridación por transferencia Southern del modo descrito en "Molecular Cloning", 2ª edición [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, página 9.31 (1989)] usando como sonda el producto de PCR marcado con ³²P, y se detectó una sola banda de aproximadamente 8 kb mediante escisión por SphI. En consecuencia, se digirió con SphI el DNA cromosómico de *Streptoverticillium mobaraense* IFO13819 que había sido preparado mediante el método precedente, y se recuperó el fragmento de aproximadamente 8 kb por medio de electroforesis en gel de agarosa utilizando EASYTRAP ver. 2 (Takarasyuzo Co. Ltd). El fragmento recuperado fue insertado en el sitio SphI de pUC18, que fue introducido en células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Takarasyuzo Co. Ltd) para generar un banco. El banco fue explorado en cuanto a la cepa bacteriana que contiene el plásmido en que se clonó el fragmento del gen SVP35, mediante hibridación de colonias del modo descrito en "Molecular Cloning", 2ª edición [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, página 1.90 (1989)], usando el nucleótido sintético como sonda.

El plásmido fue recuperado de la cepa anteriormente obtenida y fue denominado pVSV1. Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado en pVSV1. En la ID. SEC. nº 5 se muestra la secuencia de nucleótidos de este fragmento clonado. Se dedujo la secuencia de aminoácidos primaria codificada por este gen, lo que permitió la determinación de la secuencia de aminoácidos primaria completa de SVP35 que contiene la secuencia señal de SVP35, incluyendo la secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal previamente determinada y la región que supuestamente es una parte proestructural. En la ID. SEC. nº 6 se muestra la secuencia de aminoácidos completa de SVP35. Se supone que los aminoácidos números 1-36 de la secuencia de aminoácidos descrita en la ID. SEC. nº 6 se refieren a la secuencia señal, los aminoácidos números 37-216 se refieren a la parte proestructural, y los aminoácidos números 217-537 corresponden a la SVP35 madura.

Se sintetizaron los cebadores mostrados en la ID. SEC. nº 7 y la ID.

SEC. nº 8 utilizando pVSV1 como molde por referencia a la secuencia de la ID. SEC. nº 5, y se multiplicó la región génica que contenía la parte proestructural de SVP35 y la SVP35 madura mediante una técnica de PCR. Para la reacción PCR, se usó la DNA polimerasa Pyrobest (Takarasyuzo Co. Ltd.), y la condición de reacción siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

A continuación, utilizando como molde el pPKSPTG1 descrito en el documento WO 01/23591, se multiplicó la región que incluye la región 5'-cadena arriba que contiene la región promotora del gen de PS2, que es una proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, y la secuencia señal de SlpA, una proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*, mediante una técnica de PCR utilizando la combinación de los oligonucleótidos de las ID. SEC. nº 9 e ID. SEC. nº 10. El cebador mostrado en la ID. SEC. nº 10 contiene la secuencia que codifica los aminoácidos N-terminales de SVP35 que tienen una parte proestructural.

Luego se multiplicó el gen del fragmento génico de preproSVP35 de fusión heteróloga, que estaba conectado con la región 5'-cadena arriba que comprende la región promotora del gen de PS2 y la secuencia señal de SlpA, la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*, llevando a cabo una PCR con sobrecruzamiento con la ID. SEC. nº 8 y la ID. SEC. nº 9 usando una mezcla de 1 µl de cada una de las disoluciones de PCR multiplicadas. El fragmento multiplicado de aproximadamente 2,3 kb fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa. Se sometió el producto de PCR a una electroforesis en gel de agarosa para recuperar un fragmento de aproximadamente 2,3 kb y, después de dejar romos sus extremos usando DNA Blunting Kit (Takarasyuzo Co. Ltd.), se insertó el fragmento en el sitio SmaI de pCV7 del modo descrito en JP-Kokai nº 9-070291 para obtener pVSV1. Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento insertado, de acuerdo con el método convencional, para confirmar que se había construido el gen de fusión del modo esperado.

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido pVSV1 construido y se seleccionaron las cepas cultivadas en un 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 y 15 g de agar por litro de agua destilada). La *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionada que portaba pVSV1 fue luego cultivada en medio de cultivo MMTG (60 g de glucosa, 0,4 g de sulfato magnésico heptahidratado, 30 g de sulfato amónico, 1 g de dihidrogenofosfato potásico, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidratado, 0,01 g de sulfato de manganeso pentahidratado, 450 µg de hidrocloreuro de tiamina, 450 µg de biotina, 0,15 g de D,L-metionina y 50 g de carbonato cálcico por litro de

agua destilada; pH ajustado a 7,5) que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol a 30 °C durante 30 horas. Se centrifugó 1 ml del medio de cultivo para separar el sobrenadante del cultivo y las bacterias. La actividad de SVP35 se detectó en el sobrenadante del cultivo y, como resultado de una electroforesis SDS-PAGE [Nature 227, 380-685 (1970)] de acuerdo con el método de Laemmli, se confirmó que se expresaban-secretaban aproximadamente 200 mg/l de SVP35.

Ejemplo 2: Conversión de transglutaminasa de *Streptovercillium mobaraense* IFO13819 (pro-MTG) en una forma activa

Utilizando pro-MTG (1 mg/ml) expresada por *Corynebacterium glutamicum* como un sustrato purificado, se mezcló la proteasa neutra (SVP35, SVP70) de *Streptovercillium mobaraense* o la metaloproteasa neutra SGMP II de *Streptomyces griseus* en una relación de sustrato:enzima = 200:1 y se dejó reaccionar la mezcla a 30 °C. Después de 0, 1, 2, 4, 7 y 20 horas, se tomaron secuencialmente partes alícuotas de la mezcla de reacción y se mezclaron con tampón de muestras para SDS-PAGE, y se calentaron las mezclas a 95 °C durante 3 minutos y se sometieron luego a SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli [Nature 227, 680-685 (1970)]. El resultado se muestra en la Figura 6. Como se puede ver en la Figura 6, cuando se hicieron reaccionar estas proteasas, las pro-MTGs se convirtieron en las formas maduras, y las MTGs producidas no se redujeron ni siquiera después de una reacción de larga duración. Se midió la actividad transglutaminasa (TG) de la fracción recogida mediante el método del hidroxamato y se confirmó la actividad suficiente. Además, se purificó la SGMP II a partir de actinasa (Kakenseiyaku Co. Ltd) de acuerdo con el método de referencia (J. Biochem., volumen 110, páginas 339-344, 1991).

Luego se añadieron la metaloproteasa neutra SVP70 de *Streptovercillium mobaraense* y la serina proteasa SAM-P45 (*Streptomyces albogriseolus*) como testigo a las pro-MTGs aumentando gradualmente la cantidad de estas enzimas, llevándose la reacción a cabo a 30 °C y en un pH de 7,0. Después de 1, 4, 7 y 24 horas, se recogieron secuencialmente fracciones de la mezcla de reacción para determinar la actividad TG mediante el método del hidroxamato (véase la Figura 7). Se midió la concentración de proteína de la TG por cromatografía en fase inversa (véase la Figura 8). Como resultado, se mostró que SVP podía convertir la pro-MTG en la MTG activa con una cantidad tan pequeña como el 1/500 del sustrato. Se mostró que SAM-P45 sólo generaba una actividad transglutaminasa insuficiente incluso en una cantidad del 1/50 del sustrato y que no se observaba la conversión completa en la forma activa. Por otra parte, cuando se añadía SAM-P45 en una cantidad del 1/10 del

sustrato, se observaba la conversión en la MTG activa, pero se observaba una disminución en la cantidad y la actividad de la proteína MTG. Esto sugiere que tenía lugar la sobredescomposición de la MTG madura por SAM-P45.

5 El presente invento proporciona una nueva proteasa procedente de un actinomiceto, *Streptoverticillium mobaraense*, que escinde específicamente la parte proestructural del precursor de transglutaminasa para activarlo, y el gen de la misma. La nueva proteasa de acuerdo con el presente invento puede ser expresada en gran cantidad por una bacteria corineforme y, por ello, el presente invento proporciona un método para producir eficazmente transglutaminasa a partir de microorganismos.

10 La ventaja de utilizar las metaloproteasas neutras de actinomicetos de acuerdo con el presente invento para la producción de una MTG activa es que estas enzimas presentan unas potentes actividades en cuanto a escindir selectivamente la parte proestructural de la pro-MTG y que estas enzimas pueden ser extracelularmente expresadas por una bacteria corineforme.

15 Como se muestra que la pro-MTG de actinomicetos puede ser eficazmente expresada y secretada por una bacteria corineforme, es posible producir más eficazmente una MTG activa mediante una sola célula bacteriana al hacer que se co-expresen y secreten la pro-MTG y la metaloproteasa neutra. En este caso, sólo basta que se exprese la metaloproteasa neutra en una cantidad necesaria y suficiente para
20 escindir la parte proestructural de la pro-MTG.

Referencias

1. JP-Kokoku nº 1-50382
2. JP-Kokai nº 64-27471
3. Publicación WO nº 01/2351
- 25 4. JP-Kokai nº 6-502548
5. JP-Kokai nº 10-108675
6. Eur. J. Biochem., volumen 257, páginas 570-576, 1998
7. J. Biochem., volumen 110, páginas 339-344, 1991

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Método para producir transglutaminasa microbiana

<130> OP04093

<150> JP 2003-61623

<151> 2003-03-07

<160> 11

<170> PatentIn, versión 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> *Streptovercillium mobaraense*

<400> 1

Gly Thr Gly Thr Ser Thr Tyr Ser Gly Thr Val Pro Leu Thr Thr Thr
 1 5 10 15

Lys Ser Gly Ser
 20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> *Streptovercillium mobaraense*

<400> 2

Gly Thr Gly Asn Ser Gln Gly Ser Gly Gln Val
 1 5 10

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 3

ggctcgggca agagcctcta ctcgggcacg

30

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 4
 tcagctcagc ttgatcgcg tccaggaggc 30

<210> 5
 <211> 1614
 <212> DNA
 <213> *Streptovercillium mobaraense*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1611)

<400> 5
 gtg ttg aga ctc acc gcc acc ccc cgc acc acg gcc ctg cgt gcc gcc 48
 Val Leu Arg Leu Thr Ala Thr Pro Arg Thr Thr Ala Leu Arg Ala Ala
 1 5 10 15

gcc ctc gtc gcc tcc gcg gcc atg gtc gtc gtc gcc gtg cag acg gcc 96
 Ala Leu Val Ala Ser Ala Ala Met Val Val Val Gly Val Gln Thr Gly
 20 25 30

agc gcg agc gcc tcg ggt gac cgt gac agc gga ggg ctg cca ctg acg 144
 Ser Ala Ser Ala Ser Gly Asp Arg Asp Ser Gly Gly Leu Pro Leu Thr
 35 40 45

ctc tcc gcg agc cag cgc acc gcc gcc atc cag gag gcc cag agc gcc 192
 Leu Ser Ala Ser Gln Arg Thr Ala Ala Ile Gln Glu Ala Gln Ser Gly
 50 55 60

gcg tcg gcg acc gcc gcc aag atc gcc ctg agc gcc aag gag aag ctg 240
 Ala Ser Ala Thr Ala Ala Lys Ile Gly Leu Ser Gly Lys Glu Lys Leu
 65 70 75 80

atc gcc cgc gac gtc gtc aag gac gcc gac gcc acc gtc cac acg cgc 288
 Ile Ala Arg Asp Val Val Lys Asp Ala Asp Gly Thr Val His Thr Arg
 85 90 95

tac gag cgc acc tac gac ggg ctg ccc gtg ctc gcc gcc gac ctg atc 336
 Tyr Glu Arg Thr Tyr Asp Gly Leu Pro Val Leu Gly Gly Asp Leu Ile
 100 105 110

gtc cac gag gcg aag gcc gga cgc tcg gtc acc aag gcg aac gac gcg Val His Glu Ala Lys Ala Gly Arg Ser Val Thr Lys Ala Asn Asp Ala 115 120 125	384
acc ata gcc ctg ccc tcg acc gac gcc tcc ctg gcc ccg gcc gcg gcg Thr Ile Ala Leu Pro Ser Thr Asp Ala Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala 130 135 140	432
aag aag tcg gcg ctg agc gcc gcc gcc gac cag aag acc gcc aag gcg Lys Lys Ser Ala Leu Ser Ala Ala Ala Asp Gln Lys Thr Ala Lys Ala 145 150 155 160	480
gac ggc cag gcg ccg cgc aag gtc gtc tgg gcc gcg cag ggc aag ccg Asp Gly Gln Ala Pro Arg Lys Val Val Trp Ala Ala Gln Gly Lys Pro 165 170 175	528
gtc ctg gcg tac gag acc gtg gtc acg gcc gtg cag aag gac ggc acc Val Leu Ala Tyr Glu Thr Val Val Thr Gly Val Gln Lys Asp Gly Thr 180 185 190	576
ccg agc gag ctg cac gtg atc acc gac gcg gcg tcc gcc aag aag ctg Pro Ser Glu Leu His Val Ile Thr Asp Ala Ala Ser Gly Lys Lys Leu 195 200 205	624
tac cag tac gag gcc atc gag acc ggt acc gcc acc agc acc tac agc Tyr Gln Tyr Glu Ala Ile Glu Thr Gly Thr Gly Thr Ser Thr Tyr Ser 210 215 220	672
ggc acc gtg ccg ctg acc acc acc aag tcg gcc tcc cag tac cag ctc Gly Thr Val Pro Leu Thr Thr Thr Lys Ser Gly Ser Gln Tyr Gln Leu 225 230 235 240	720
aac gac ggc gcg cgc ggc ggc cac aag acg tac gac ctc aac cag ggc Asn Asp Gly Ala Arg Gly Gly His Lys Thr Tyr Asp Leu Asn Gln Gly 245 250 255	768
aag tcc gcc acc ggt tcg ctg ttc acc aac agc acc gac acc tgg gcc Thr Ser Gly Thr Gly Ser Leu Phe Thr Asn Ser Thr Asp Thr Trp Gly 260 265 270	816
ggc ggc cgg cag acg gcc ggt gtc gac gcg cac tac gcc gcg gcc gtg Gly Gly Arg Gln Thr Ala Gly Val Asp Ala His Tyr Gly Ala Ala Val 275 280 285	864
acc tgg gac ttc tac aag aac gtc ttc gcc cgc aac gcc atc cgc aac Thr Trp Asp Phe Tyr Lys Asn Val Phe Gly Arg Asn Gly Ile Arg Asn 290 295 300	912
gac ggc aag gcc gcc tac tcc cgc gtc cac tac gcc aac agc tac gtg Asp Gly Lys Ala Ala Tyr Ser Arg Val His Tyr Gly Asn Ser Tyr Val 305 310 315 320	960

aac gcc ttc tgg tcc gac tcc tgc ttc tgc atg acc tac gcc gac gcc Asn Ala Phe Trp Ser Asp Ser Cys Phe Cys Met Thr Tyr Gly Asp Gly	1008
325 330 335	
cag aac aac aag aac ccg ctc acc gcc ctc gac gtg gcg gcc cac gag Gln Asn Asn Lys Asn Pro Leu Thr Ala Leu Asp Val Ala Ala His Glu	1056
340 345 350	
atg agc cac gcc gtc acc gcc gcc acg gcc aag ctc gtg tac agc gcc Met Ser His Gly Val Thr Ala Ala Thr Ala Lys Leu Val Tyr Ser Gly	1104
355 360 365	
gag tcg gcc gcc ctc aac gag gcg acc agc gac atc ttc gcc acc gcc Glu Ser Gly Gly Leu Asn Glu Ala Thr Ser Asp Ile Phe Gly Thr Ala	1152
370 375 380	
gtc gag ttc tac gcc aac aac aag acc gac gtg gcc gac tac ctc atc Val Glu Phe Tyr Ala Asn Asn Lys Thr Asp Val Gly Asp Tyr Leu Ile	1200
385 390 395 400	
ggc gag aag atc aac atc tac gcc gac gcc aag ccg ctg cgc tac atg Gly Glu Lys Ile Asn Ile Tyr Gly Asp Gly Lys Pro Leu Arg Tyr Met	1248
405 410 415	
gac aag ccg agc aag gac gcc aag tcc aag gac agc tgg tac tcc gcc Asp Lys Pro Ser Lys Asp Gly Lys Ser Lys Asp Ser Trp Tyr Ser Gly	1296
420 425 430	
atc gcc ggg gtg gac gtc cac tac tcg tcc gcc ccg gcc aac cac ttc Ile Gly Gly Val Asp Val His Tyr Ser Ser Gly Pro Ala Asn His Phe	1344
435 440 445	
ttc tac ctg ctc tcc gag gcc agc ggg aag aag acg atc aac gcc gtg Phe Tyr Leu Leu Ser Glu Gly Ser Gly Lys Lys Thr Ile Asn Gly Val	1392
450 455 460	
gac tac gac agc ccg acc gcc gac ggg tcc aag gtc acc gcc atc gcc Asp Tyr Asp Ser Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Val Thr Gly Ile Gly	1440
465 470 475 480	
ccg gac aag gcc cag aag atc tgg tac aag gcg ctg acc acg cag ttc Arg Asp Lys Ala Gln Lys Ile Trp Tyr Lys Ala Leu Thr Thr Gln Phe	1488
485 490 495	
acc tcg aac acc aac tac gcc aag gcg cgc acc gcc acc ctg aac gcc Thr Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Lys Ala Arg Thr Gly Thr Leu Asn Ala	1536
500 505 510	
gcc gcg tcg ctc tac gcc aac aac agc gcg gag tac aag gcg gtg gcg Ala Ala Ser Leu Tyr Gly Asn Asn Ser Ala Glu Tyr Lys Ala Val Ala	1584
515 520 525	

gcg gcc tgg tcc gcc atc aac gtc aag tag 1614
 Ala Ala Trp Ser Ala Ile Asn Val Lys
 530 535

<210> 6
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> *Streptovercillium mobaraense*

<400> 6
 Val Leu Arg Leu Thr Ala Thr Pro Arg Thr Thr Ala Leu Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ala Ser Ala Ala Met Val Val Val Gly Val Gln Thr Gly
 20 25 30

Ser Ala Ser Ala Ser Gly Asp Arg Asp Ser Gly Gly Leu Pro Leu Thr
 35 40 45

Leu Ser Ala Ser Gln Arg Thr Ala Ala Ile Gln Glu Ala Gln Ser Gly
 50 55 60

Ala Ser Ala Thr Ala Ala Lys Ile Gly Leu Ser Gly Lys Glu Lys Leu
 65 70 75 80

Ile Ala Arg Asp Val Val Lys Asp Ala Asp Gly Thr Val His Thr Arg
 85 90 95

Tyr Glu Arg Thr Tyr Asp Gly Leu Pro Val Leu Gly Gly Asp Leu Ile
 100 105 110

Val His Glu Ala Lys Ala Gly Arg Ser Val Thr Lys Ala Asn Asp Ala
 115 120 125

Thr Ile Ala Leu Pro Ser Thr Asp Ala Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala
 130 135 140

Lys Lys Ser Ala Leu Ser Ala Ala Ala Asp Gln Lys Thr Ala Lys Ala
 145 150 155 160

ES 2 356 149 T3

Asp Gly Gln Ala Pro Arg Lys Val Val Trp Ala Ala Gln Gly Lys Pro
 165 170 175

Val Leu Ala Tyr Glu Thr Val Val Thr Gly Val Gln Lys Asp Gly Thr
 180 185 190

Pro Ser Glu Leu His Val Ile Thr Asp Ala Ala Ser Gly Lys Lys Leu
 195 200 205

Tyr Gln Tyr Glu Ala Ile Glu Thr Gly Thr Gly Thr Ser Thr Tyr Ser
 210 215 220

Gly Thr Val Pro Leu Thr Thr Thr Lys Ser Gly Ser Gln Tyr Gln Leu
 225 230 235 240

Asn Asp Gly Ala Arg Gly Gly His Lys Thr Tyr Asp Leu Asn Gln Gly
 245 250 255

Thr Ser Gly Thr Gly Ser Leu Phe Thr Asn Ser Thr Asp Thr Trp Gly
 260 265 270

Gly Gly Arg Gln Thr Ala Gly Val Asp Ala His Tyr Gly Ala Ala Val
 275 280 285

Thr Trp Asp Phe Tyr Lys Asn Val Phe Gly Arg Asn Gly Ile Arg Asn
 290 295 300

Asp Gly Lys Ala Ala Tyr Ser Arg Val His Tyr Gly Asn Ser Tyr Val
 305 310 315 320

Asn Ala Phe Trp Ser Asp Ser Cys Phe Cys Met Thr Tyr Gly Asp Gly
 325 330 335

Gln Asn Asn Lys Asn Pro Leu Thr Ala Leu Asp Val Ala Ala His Glu
 340 345 350

Met Ser His Gly Val Thr Ala Ala Thr Ala Lys Leu Val Tyr Ser Gly
 355 360 365

Glu Ser Gly Gly Leu Asn Glu Ala Thr Ser Asp Ile Phe Gly Thr Ala
 370 375 380

Val Glu Phe Tyr Ala Asn Asn Lys Thr Asp Val Gly Asp Tyr Leu Ile
 385 390 395 400

Gly Glu Lys Ile Asn Ile Tyr Gly Asp Gly Lys Pro Leu Arg Tyr Met
 405 410 415

Asp Lys Pro Ser Lys Asp Gly Lys Ser Lys Asp Ser Trp Tyr Ser Gly
 420 425 430

Ile Gly Gly Val Asp Val His Tyr Ser Ser Gly Pro Ala Asn His Phe
 435 440 445

Phe Tyr Leu Leu Ser Glu Gly Ser Gly Lys Lys Thr Ile Asn Gly Val
 450 455 460

Asp Tyr Asp Ser Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys Val Thr Gly Ile Gly
 465 470 475 480

Arg Asp Lys Ala Gln Lys Ile Trp Tyr Lys Ala Leu Thr Thr Gln Phe
 485 490 495

Thr Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Lys Ala Arg Thr Gly Thr Leu Asn Ala
 500 505 510

Ala Ala Ser Leu Tyr Gly Asn Asn Ser Ala Glu Tyr Lys Ala Val Ala
 515 520 525

Ala Ala Trp Ser Ala Ile Asn Val Lys
 530 535

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 7

tccggtgacc gtgacagcgg agggc

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 8

gcgagtagcc gaggtcgatc acgtc

25

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 9

aaattcctgt gaattagctg atttag

26

<210> 10

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 10

ctccgctgtc acggtcaccc gatgccgttg ccacaggtgc ggcc

44

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> *Streptovercillium mobaraense*

<400> 11

Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser

1

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una transglutaminasa microbiana activa a partir de una protransglutaminasa microbiana, que comprende cultivar un microorganismo en que se ha introducido un gen que codifica una metaloproteasa neutra procedente de actinomicetos, produciéndose por ello la metaloproteasa neutra, y escindir selectivamente una parte proestructural de la protransglutaminasa mediante la metaloproteasa neutra que es producida por el microorganismo, en que la metaloproteasa neutra procedente de actinomicetos se caracteriza por que
- 1) tiene un peso molecular de aproximadamente 35.000;
 - 2) tiene un pH óptimo de 7,0;
 - 3) es estable en un pH de 4-10;
 - 4) tiene una temperatura óptima de aproximadamente 45 °C;
 - 5) es estable por debajo de aproximadamente 50 °C; y
 - 6) es fuertemente inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenanolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, y por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos; o
 - 7) tiene un peso molecular de aproximadamente 71.000;
 - 8) tiene un pH óptimo de 7,0;
 - 9) es estable en un pH de 5-10;
 - 10) tiene una temperatura óptima de aproximadamente 55 °C; y
 - 11) es fuertemente inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético, la 1,10-fenanolina y el fosforamidón, que son inhibidores de metaloproteasas, el ditiotreitól, que es un agente reductor de enlaces disulfuro, y por el inhibidor de la subtilisina de *Streptomyces* (SSI) procedente de actinomicetos.
2. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el microorganismo en que se ha introducido un gen que codifica una metaloproteasa neutra de actinomicetos es una bacteria corineforme.
3. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la metaloproteasa neutra que tiene el peso molecular de aproximadamente 35.000 tiene la secuencia de aminoácidos N-terminal de la ID. SEC. nº 1.
4. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la metaloproteasa neutra que tiene el peso molecular de aproximadamente 71.000 tiene la secuencia de aminoácidos N-terminal de la ID. SEC. nº 2.
5. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la metaloproteasa neutra que tiene el peso molecular de aproximadamente 35.000 tiene la secuen-

cia de aminoácidos de las posiciones de aminoácido 217-537 de la ID. SEC. nº 6.

6. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en que se produce dicha protransglutaminasa al cultivar un microorganismo en que se introducido un gen que codifica la protransglutaminasa.

FIG. 1

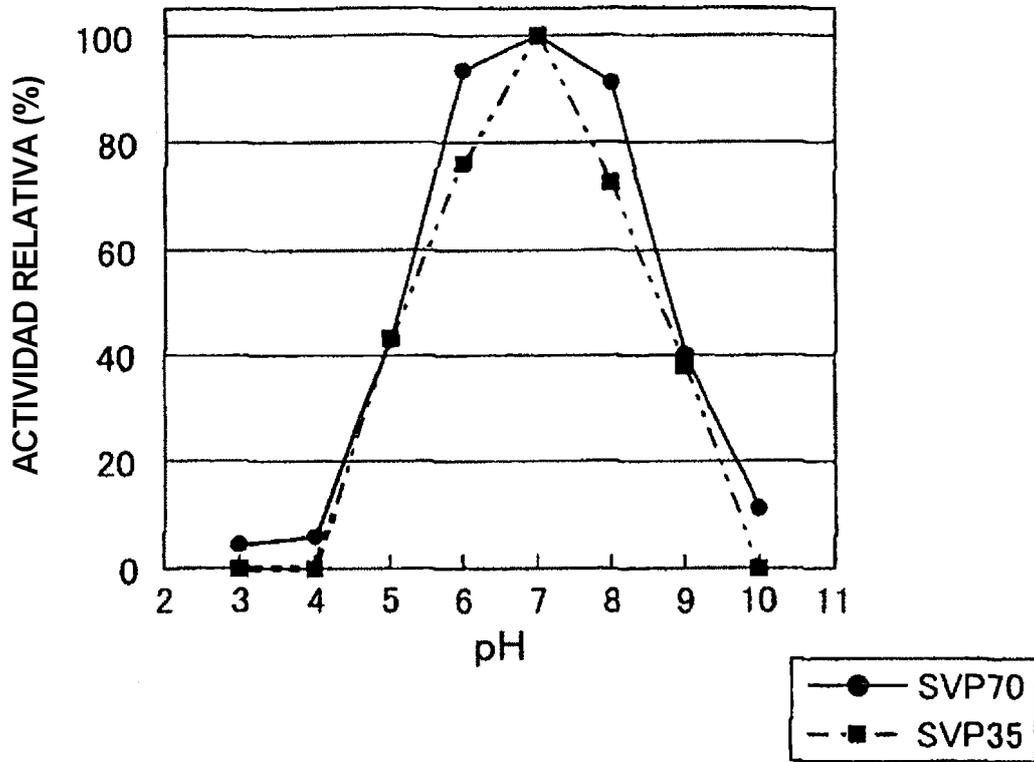


FIG. 2

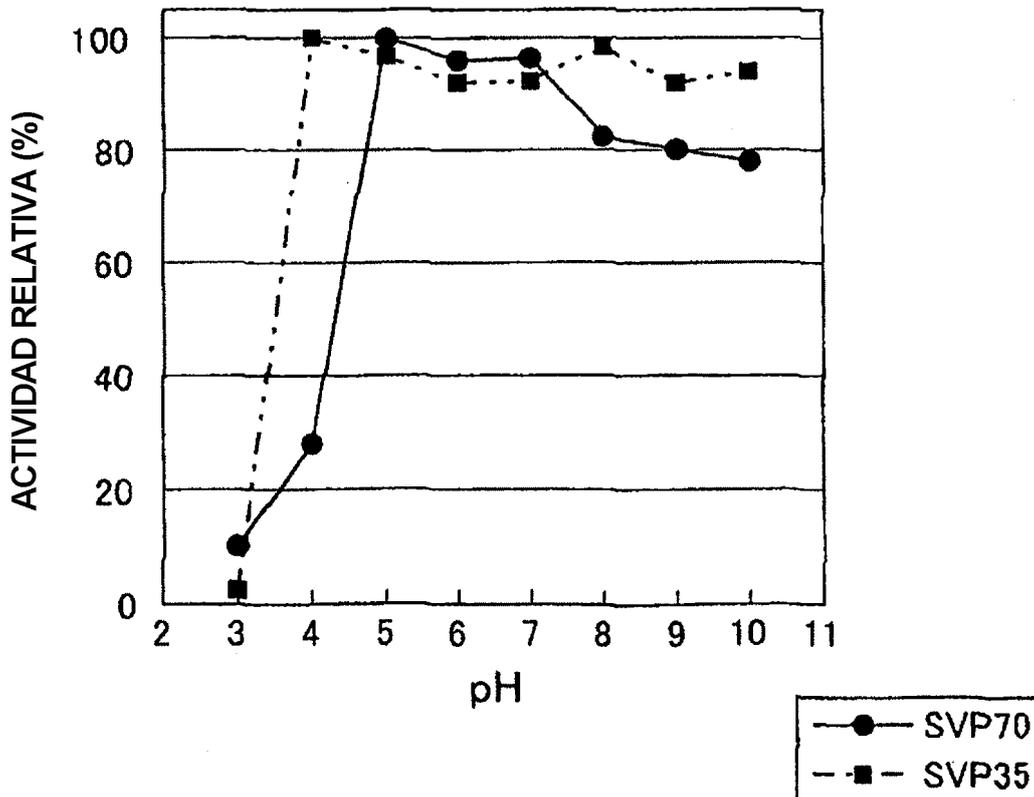


FIG. 3

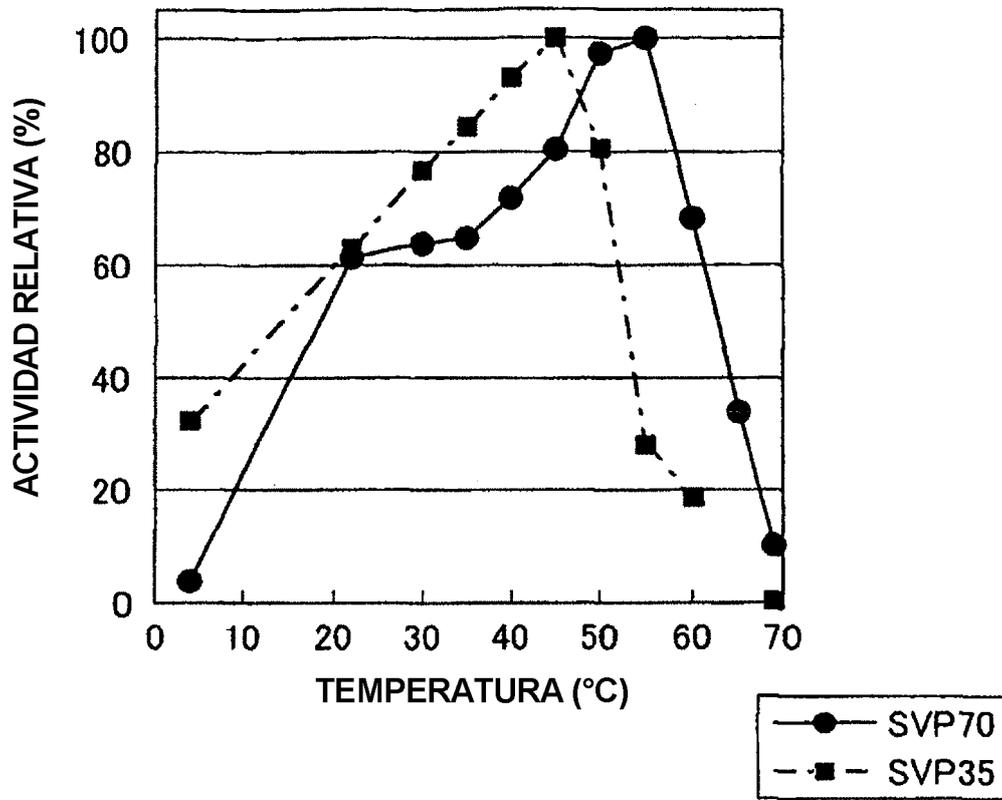


FIG. 4

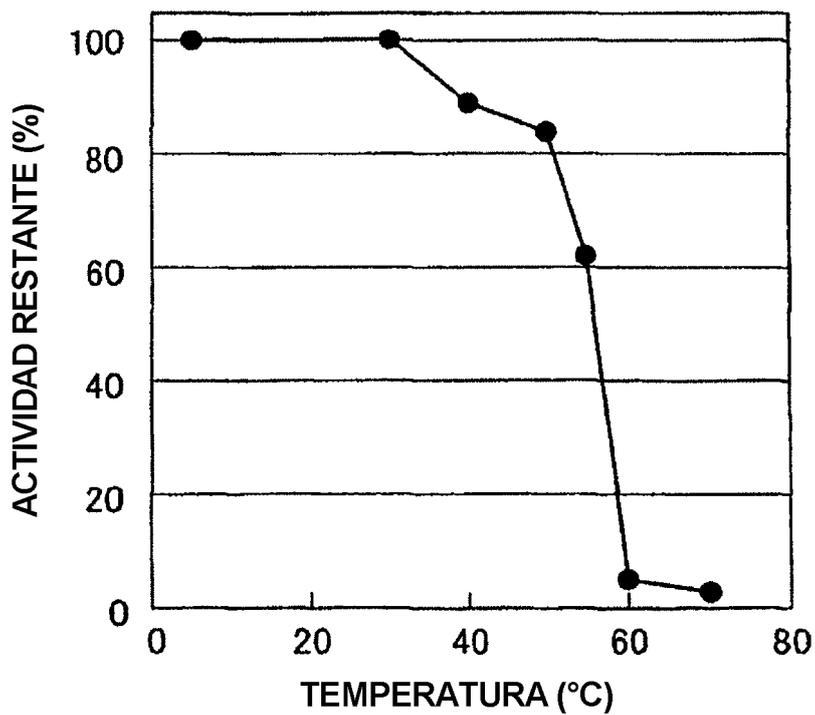


FIG. 5

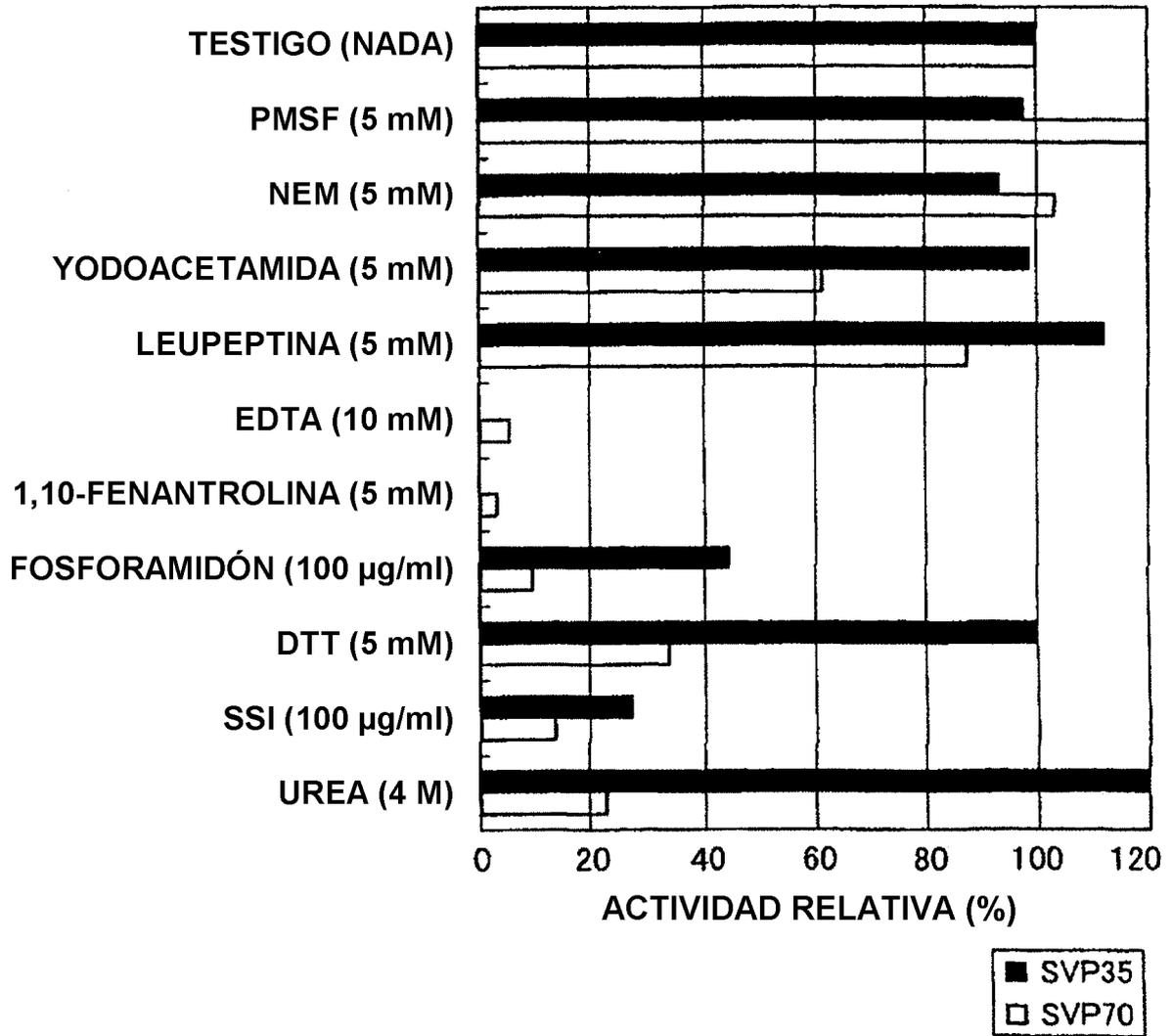


FIG. 6

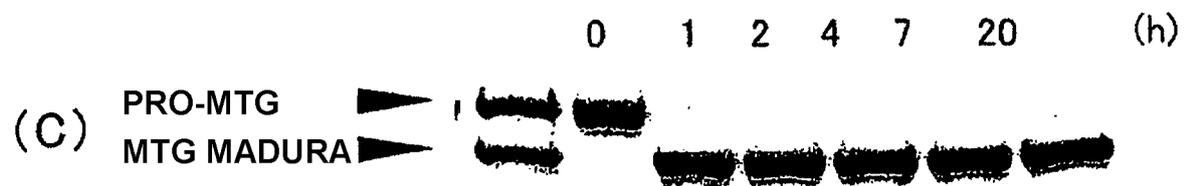
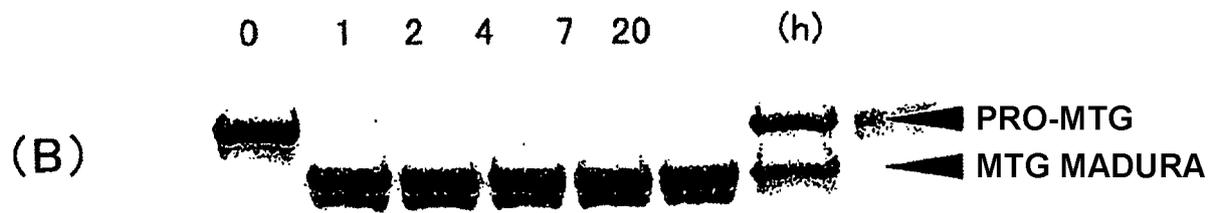
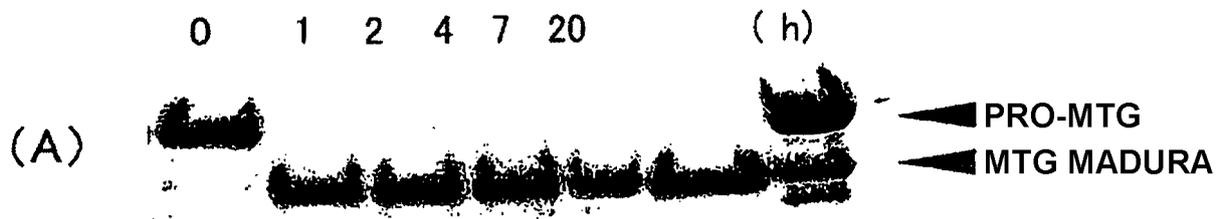


FIG. 7

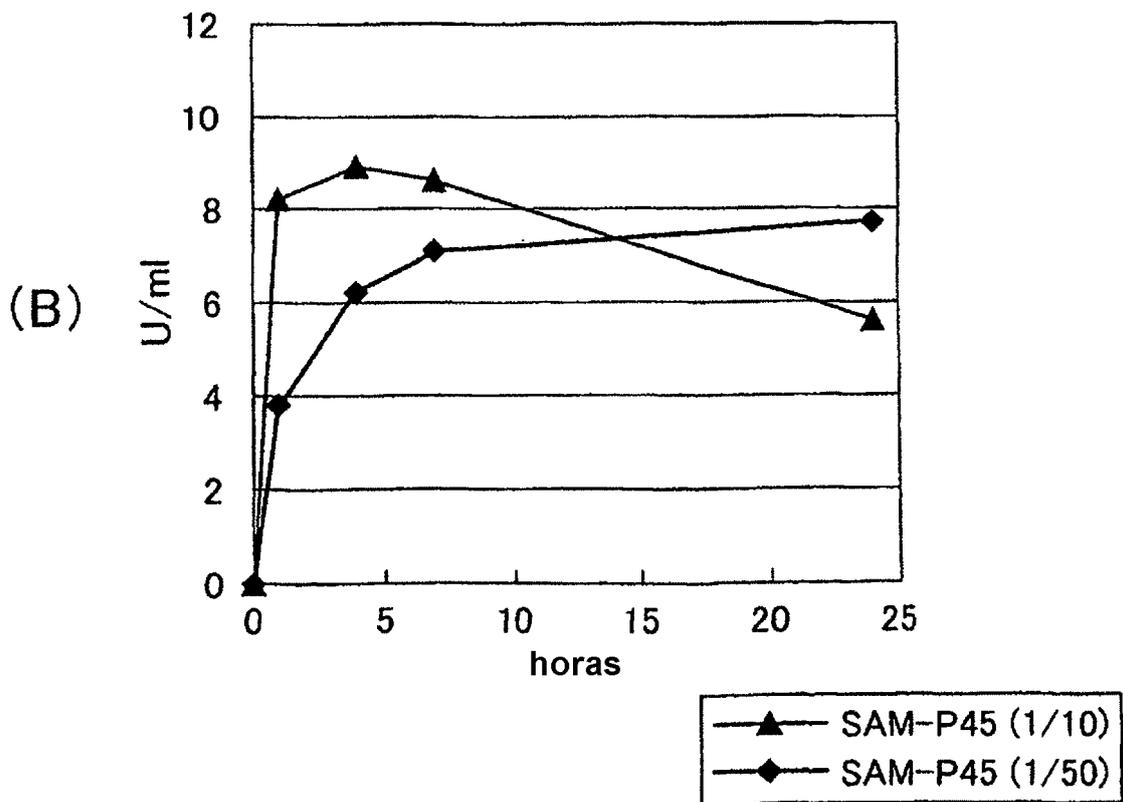
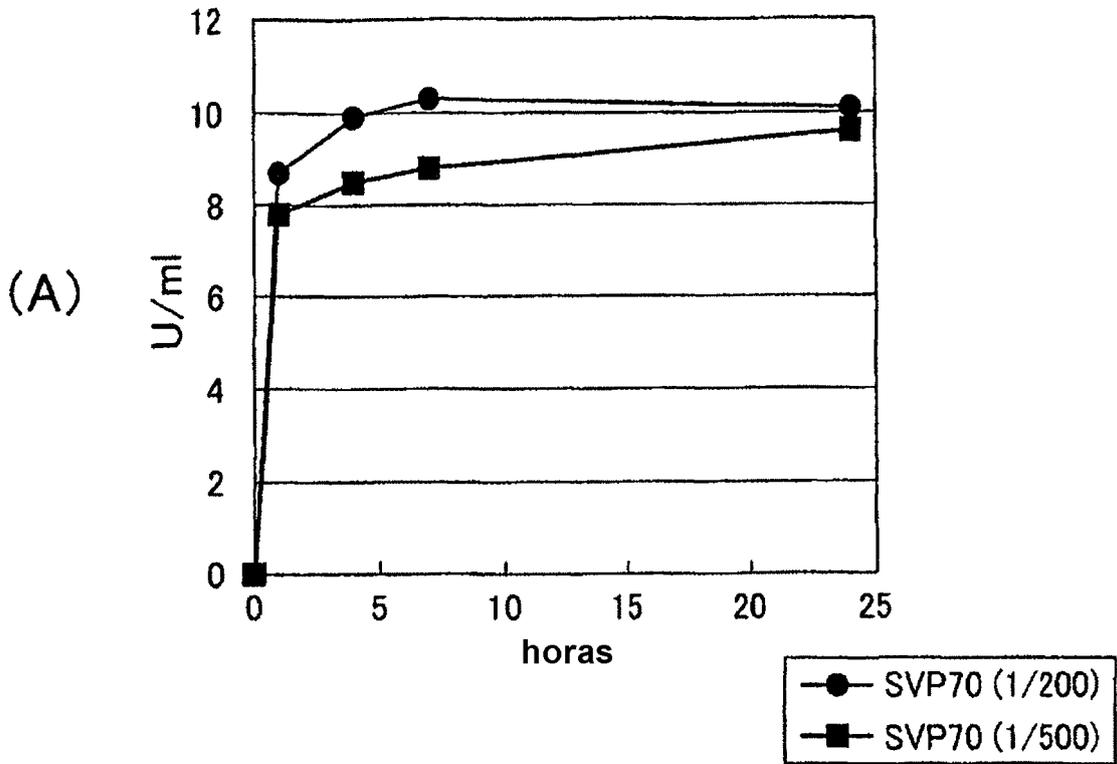


FIG. 8

