



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 354**

51 Int. Cl.:
C12P 21/06 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02805661 .2**
96 Fecha de presentación : **20.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1572895**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Métodos para producir hialuronano en una célula huésped recombinante.**

30 Prioridad: **21.12.2001 US 342644 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.07.2011

73 Titular/es: **NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es: **Sloma, Alan;**
Behr, Regine;
Widner, William;
Tang, Maria;
Sternberg, David y
Brown, Stephen

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

ES 2 362 354 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

Métodos para producir hialuronano en una célula huésped recombinante

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos para producir un hialuronano en una célula huésped recombinante.

Descripción de las técnicas relacionadas

10 [0002] Los heteropolisacáridos más abundantes del cuerpo son los glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos son polímeros de carbohidrato de cadena recta, que consisten en repetir unidades de disacárido (sólo queratán sulfato se ramifica en la región central del carbohidrato). Las unidades de disacárido generalmente comprenden, como una primera unidad sacárida, uno de dos azúcares modificados - N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc). La segunda unidad es normalmente un ácido urónico, tal como ácido glucurónico (GlcUA) o iduronato.

15 [0003] Los glicosaminoglicanos son moléculas cargadas negativamente, y tienen una conformación extendida que imparte alta viscosidad cuando están en solución. Glicosaminoglicanos se localizan principalmente en la superficie de células o en la matriz extracelular. Glicosaminoglicanos también tienen comprimibilidad baja en solución y, como resultado, son ideales como un fluido de lubricación fisiológica, por ejemplo, articulaciones. La rigidez de glicosaminoglicanos proporciona integridad estructural a células y proporciona vías de paso entre células, que permiten la migración celular. Los glicosaminoglicanos de mayor importancia fisiológica son hialuronano, sulfato de condroitina, heparina, heparán sulfato, dermatán sulfato, y queratán sulfato. Muchos glicosaminoglicanos se enlazan de manera covalente a una proteína de núcleo de proteoglicano a través de estructuras de oligosacárido específicas. Hialuronano forma agregados grandes con proteoglicanos determinados, pero es una excepción como cadenas de carbohidrato libres de complejos no covalentes con proteoglicanos.

20

25

[0004] Funciones numerosas de hialuronano en el cuerpo han sido identificadas (véase, Laurent T. C. y Frasen J. R. E., 1992, FASEB J. 6: 2397-2404; y Toole B.P., 1991, "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation." En: Cell Biology of the Extracellular Matrix, pp. 305-341, Hay E. D., ed., Plenum, New York). El hialuronano está presente en el cartilago hialino, líquido sinovial, y tejido de piel, tanto de la dermis como epidermis. Se sospecha también que el hialuronano tiene un papel en numerosas funciones fisiológicas, tal como adhesión, desarrollo, motilidad celular, cáncer, angiogénesis, y cicatrización de una herida. Debido a las únicas propiedades biológicas y físicas del hialuronano, se emplea en la cirugía ocular y de articulaciones y está siendo evaluado en otros procedimientos médicos. Productos de hialuronano también han sido desarrollados para el uso en ortopedia, reumatología, y dermatología.

30

35

[0005] Crestas de gallo son una fuente comercial significativa de hialuronano. Los microorganismos son una fuente alternativa. La patente estadounidense n°. 4,801,539 divulga un método para preparar ácido hialurónico que implica una cepa de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3,6 g de ácido hialurónico por litro. La patente europea n°. EP0694616 divulga procesos de fermentación que usan una cepa mejorada de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3.5 g de ácido hialurónico por litro.

40

[0006] Los microorganismos usados para la producción de ácido hialurónico por fermentación son cepas de bacterias patógenas, en primer lugar entre éstas siendo varias *Streptococcus spp.* Los estreptococos de grupo A y grupo C se rodean ellos mismos con una cápsula no antigénica compuesta por hialuronano, que es idéntica en composición a aquella encontrada en el tejido conjuntivo y articulaciones. *Pasteurella multocida*, otras bacterias de encapsulación patógenas, también rodean sus células con hialuronano.

[0007] Hialuronano sintasas han sido descritas de vertebrados, patógenos bacterianos, y virus algales (DeAngelis, P.L., 1999 Cell. Mol. Life Sci. 56: 670-682). WO 99/23227 divulga una hialuronato sintasa grupo I de *Streptococcus equisimilis*. WO 99/51265 y WO 00/27437 describen una hialuronato sintasa de grupo II de *Pasteurella multocida*. Ferretti et al. revelan el operón de hialuronano sintasa de *Streptococcus pyogenes*, que se compone de tres genes, hasA, hasB, y hasC, que codifican hialuronato sintasa, UDP glucosa deshidrogenasa, y UDP-glucosa pirofosforilasa, respectivamente (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001). WO 99/51265 describe un segmento de ácido nucleico con una región de codificación para una hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis*.

[0008] Bacilos son bien establecidos como sistemas de célula huésped para la producción de proteínas recombinantes y nativas. Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para producir un hialuronano en una célula huésped de *Bacillus* recombinante.

Breve resumen de la invención

[0009] La presente invención se refiere a:

Un método para la producción de un ácido hialurónico, que comprende: (I) cultivar una célula huésped de *Bacillus* bajo condiciones adecuadas para la producción del ácido hialurónico, donde la célula huésped de *Bacillus* comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende un operón artificial que comprende una secuencia codificante de hialuronano sintasa, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazada a una secuencia del promotor foránea a la secuencia de codificación de hialuronano sintasa: donde

(a) la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 95, SEC ID n°: 93, o SEC ID n°: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 94, SEC ID n°: 92, o SEC ID n°: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (II):

(b) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 97, o SEC ID n°: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 11, SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 96, o SEC ID n°: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii);

(c) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 22, SEC ID n°: 43, SEC ID n°: 99, o SEC ID n°: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 21, SEC ID n°: 42 o SEC ID n°: 98, o SEC ID n°: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (II):

y (ii) recuperación del ácido hialurónico del medio de cultivo.

[0010] La presente invención también se refiere a células huéspedes de *Bacillus* que comprenden:

- Una célula huésped de *Bacillus* que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende un operón artificial que comprende un hialuronano: secuencia de codificación de sintasa, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazada a una secuencia del promotor foránea a la secuencia codificante de hialuronano sintasa, donde
- (a) la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 95, SEC ID n°: 93, o SEC ID n°: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 94, SEC ID n°: 92, o SEC ID n°: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii);
- (b) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 97, o SEC ID n°: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 11, SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 96, o SEC ID n°: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii);
- (c) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 22, SEC ID n°: 43, SEC ID n°: 99, o SEC ID n°: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 21, SEC ID n°: 42 o SEC ID n°: 98, o SEC ID n°: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

Breve descripción de las figuras

- [0011]
- Figura 1 muestra la estructura química de hialuronano.
- Figura 2 muestra la vía biosintética para la síntesis de hialuronano.
- Figura 3 muestra un mapa de restricción de pCR2.1-*sehasA*.
- Figura 4 muestra un mapa de restricción de pCR2.1-*tuaD*.
- Figura 5 muestra un mapa de restricción de pCR2.1-*gtaB*.
- Figura 6 muestra un mapa de restricción de pCR2.1-*gcaD*.
- Figura 7 muestra un mapa de restricción de pHA1.
- Figura 8 muestra un mapa de restricción de pHA2.
- Figura 9 muestra un mapa de restricción de pHA3.
- Figura 10 muestra un mapa de restricción de pHA4.
- Figura 11 muestra un mapa de restricción de pHA5.
- Figura 12 muestra un mapa de restricción de pHA6.
- Figura 13 muestra un mapa de restricción de pHA7.
- Figura 14 muestra un mapa de restricción de pMRT106.
- Figura 15 muestra un mapa de restricción de pHA8.
- Figura. 16 muestra un mapa de restricción de pHA9.

- Figura 17 muestra un mapa de restricción de pHA10.
 Figura 18 muestra un mapa de restricción de pRB157.
 Figura 19 muestra un mapa de restricción de pMRT084.
 Figura 20 muestra un mapa de restricción de pMRT086.
 5 Figura 21 muestra un mapa de restricción de pCJ791.
 Figura 22 muestra un mapa de restricción de pMRT032.
 Figura 23 muestra un mapa de restricción de pNNB194neo.
 Figura 24 muestra un mapa de restricción de pNNB194neo-oriT.
 Figura 25 muestra un mapa de restricción de pShV3.
 10 Figura 26 muestra un mapa de restricción de pShV2.1-amyEΔB.
 Figura 27 muestra un mapa de restricción de pShV3A.
 Figura 28 muestra un mapa de restricción de pMRT036.
 Figura 29 muestra un mapa de restricción de pMRT037.
 Figura 30 muestra un mapa de restricción de pMRT041.
 15 Figura 31 muestra un mapa de restricción de pMRT064.1.
 Figura 32 muestra un mapa de restricción de pMRT068.
 Figura 33 muestra un mapa de restricción de pMRT069.
 Figura 34 muestra un mapa de restricción de pMRT071.
 Figura 35 muestra un mapa de restricción de pMRT074.
 20 Figura 36 muestra un mapa de restricción de pMRT120.
 Figura 37 muestra un mapa de restricción de pMRT122.
 Figura 38 muestra un mapa de restricción de pCR2.1-pel5'.
 Figura 39 muestra un mapa de restricción de pCR2.1-pel3'.
 Figura 40 muestra un mapa de restricción de pRB161.
 25 Figura 41 muestra un mapa de restricción de pRB162.
 Figura 42 muestra un mapa de restricción de pRB156.
 Figura 43 muestra un mapa de restricción de pRB164.
 Figura 44 muestra un resumen de fermentaciones de varias cepas de *Bacillus subtilis* productoras de ácido hialurónico ejecutadas bajo lote alimentado a aproximadamente 2 g de sacarosa/L₀-hr, 37°C.
 30 Figura 45 muestra un resumen de pesos moleculares de promedio en peso de ácido hialurónico de valor máximo (MDa) obtenidos de fermentaciones de varias cepas de *Bacillus subtilis* que producen ácido hialurónico ejecutadas bajo lote alimentado a aproximadamente 2 g de sacarosa/L₀-hr, 37°C.

Descripción detallada de la invención

- 35 [0012] La presente invención se refiere a métodos para producir un hialuronano, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped de *Bacillus* bajo condiciones adecuadas para la producción del hialuronano, donde la célula huésped de *Bacillus* comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia codificante de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia del promotor foránea a la secuencia codificante de hialuronano sintasa; y (b) recuperar el hialuronano del medio de cultivo.
 40 [0013] Los métodos de la presente invención representan una mejora sobre la producción de hialuronano de bacterias encapsulantes patógenas. En bacterias encapsulantes, una gran cantidad de hialuronano se produce en la cápsula. En el

procesamiento y depuración de hialuronano de tales fuentes, es primero necesario eliminar el hialuronano de la cápsula, tal como por el uso de un tensioactivo, o detergente, tal como SDS. Esto crea una fase de complicación en la producción comercial de hialuronano, puesto que el tensioactivo debe ser adicionado para liberar una gran parte del hialuronano, y posteriormente el tensioactivo debe ser quitado antes de la purificación final.

5

[0014] La presente invención permite la producción de una gran cantidad de un hialuronano, que se produce en una célula huésped no encapsulante, como hialuronano libre. Cuando se ve bajo el microscopio, no hay cápsula visible asociada a las cepas recombinantes de *Bacillus*, mientras que las cepas patógenas generalmente usadas en la producción de hialuronano comprenden una cápsula de hialuronano que es al menos dos veces el diámetro de la célula misma.

10

[0015] Como el hialuronano de la célula de *Bacillus* recombinante se expresa directamente al medio de cultivo, un simple proceso se puede utilizar para aislar el hialuronano del medio de cultivo. Primero, las células de *Bacillus* y el detrito celular se quitan físicamente del medio de cultivo. El medio de cultivo puede ser diluido primero, si se desea, para reducir la viscosidad del medio. Muchos métodos se conocen por los expertos en la técnica para la eliminación de células del medio de cultivo, tal como el centrifugado o la microfiltración. Si se desea, el restante sobrenadante puede luego ser filtrado, por ejemplo por ultrafiltración, para concentrar y eliminar contaminantes de molécula pequeños del hialuronano. Después de la eliminación de las células y detrito celular, una simple precipitación del hialuronano del medio se realiza por mecanismos conocidos. Sal, alcohol, o combinaciones de sal y alcohol se pueden utilizar para precipitar el hialuronano del filtrado. Una vez reducido a un precipitado, el hialuronano puede ser fácilmente aislado de la solución por medios físicos. Alternativamente, el hialuronano puede ser secado o concentrado de la solución filtrada usando técnicas vaporizables conocidas en la técnica, tal como el secado por atomización.

15

20

[0016] Los métodos de la presente invención así representan una mejora sobre las técnicas existentes para producir comercialmente hialuronano por fermentación, al no requerir el uso de un tensioactivo en la purificación de hialuronano de células en cultivo.

25

Acido hialurónico

[0017] "Ácido hialurónico" es definido aquí como un glicosaminoglicano no sulfatado compuesto por unidades de disacárido repetitivas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido glucurónico (GlcUA) enlazadas entre sí alternando enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glicosídicos (Figura 1). El ácido hialurónico es también conocido como hialuronano, hialuronato, o HA. Los términos hialuronano y ácido hialurónico se usan de forma intercambiable aquí.

30

[0018] En una forma de realización preferida, el ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 10,000,000 Da. En una forma de realización más preferida, el ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 5,000,000 Da. En una forma de realización más preferida, el ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 a aproximadamente 3,000,000 Da.

35

[0019] El nivel de ácido hialurónico producido por una célula huésped de *Bacillus* de la presente invención se puede determinar según el método modificado del carbazol (Bitter and Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334). Por otra parte, el

40

peso molecular promedio del ácido hialurónico puede ser determinado usando métodos estándares en la técnica, tales como los descritos por Ueno et al., 1988, Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" y "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California.

5

[0020] El ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención se puede someter a varias técnicas conocidas en la técnica para modificar el ácido hialurónico, tal como la reticulación como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 5,616,568, 5,652,347, y 5,874,417. Por otra parte, el peso molecular del ácido hialurónico puede ser alterado usando técnicas conocidas en la técnica.

10

Células huéspedes

[0021] En los métodos de la presente invención, la célula huésped de *Bacillus* puede ser cualquier célula de *Bacillus* adecuada para producción recombinante de ácido hialurónico. La célula huésped de *Bacillus* puede ser una célula de *Bacillus* de tipo salvaje o un mutante de la misma. Las células de *Bacillus* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Bacillus agaraderhens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*. Células de *Bacillus subtilis* mutantes particularmente adaptadas para expresión recombinante son descritas en WO 98/22598. Células de *Bacillus* no encapsulantes son particularmente útiles en la presente invención.

20

[0022] En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus clausii*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus lentus*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula huésped de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* A164Δ5 (véase patente estadounidense n°. 5,891,701) o *Bacillus subtilis* 168Δ4.

25

30

[0023] La transformación de la célula huésped de *Bacillus*, con un constructo de ácidos nucleicos de la presente invención puede, por ejemplo, ser efectuado por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278).

35

Constructos de ácidos nucleicos

[0024] "Constructo de ácidos nucleicos" se define aquí como una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácido nucleico que se combinan y superponen en cierto modo que de lo contrario no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos puede ser sinónimo del término cassette de expresión cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de

40

control requeridas para la expresión de una secuencia codificante. El término "secuencia codificante" es definido aquí como una secuencia que es transcrita en ARNm y traducida en una enzima de interés cuando se coloca bajo el control de las secuencias de control mencionadas más abajo. Los bordes de la secuencia codificante son generalmente determinados por un sitio de unión al ribosoma localizado justo arriba del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia del terminador de transcripción localizada justo debajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a secuencias de ADN, ADNc, y de ácidos nucleicos recombinantes.

[0025] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de las mismas. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas o la reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida. Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tal como la reacción en cadena de la ligasa, transcripción activada ligada, y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos puede ser utilizada. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula de *Bacillus* donde clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán replicados. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semi-sintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0026] Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una enzima se puede manipular en una variedad de vías para dar lugar a la expresión de la enzima. La manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos antes de su inserción en un constructo o vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión o célula huésped de *Bacillus*. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de clonación se conocen en la técnica. Será entendido que la secuencia de ácidos nucleicos puede también ser manipulada in vivo en la célula huésped usando métodos bien conocidos en la técnica.

[0027] Varias enzimas se implican en la biosíntesis del ácido hialurónico. Estas enzimas incluyen hialuronano sintasa, UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, amidotransferasa, mutasa, y acetil transferasa. Hialuronano sintasa es la enzima clave en la producción de ácido hialurónico.

[0028] "Hialuronano sintasa" es definida aquí como una sintasa que cataliza el alargamiento de una cadena de hialuronano por la adición de los precursores de azúcar GlcUA y GlcNAc. Las secuencias de aminoácidos de hialuronano sintasas estreptococales, hialuronano sintasas vertebradas, y la hialuronano sintasa vírica son diferentes de la *Pasteurella* hialuronano sintasa, y han sido propuestos para clasificación como hialuronano sintasas de grupo I y grupo II, las hialuronano sintasas de grupo I incluyendo hialuronano sintasas estreptococales (DeAngelis, 1999). Para la producción de hialuronano en células huéspedes de *Bacillus*, hialuronano sintasas de un origen eucariota, tales como hialuronano sintasas mamíferas, son menos preferidas.

[0029] La secuencia codificante de hialuronano sintasa puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos capaz de ser

expresada en una célula huésped de *Bacillus*. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de cualquier origen. Genes de hialuronano sintasa preferidos incluyen cualquiera del grupo I o grupo II, tales como genes de hialuronano sintasa grupo I de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus*, o genes de hialuronano sintasa del grupo II de *Pasturella multocida*.

5

[0030] En una forma de realización preferida, la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 93, o SEC ID n°: 103 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 92, o SEC ID n°: 102 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

10

[0031] En una forma de realización más preferida, la secuencia codificante de hialuronano sintasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 93, o SEC ID n°: 103 o un fragmento de la misma que tenga actividad de hialuronano sintasa.

15

[0032] En otra forma de realización preferida, la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID n°: 95 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID n°: 94 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

20

[0033] En otra forma de realización más preferida, la secuencia codificante de hialuronano sintasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 95, o un fragmento de la misma que tiene actividad de hialuronano sintasa.

25

[0034] Los métodos de la presente invención también incluyen constructos por los cuales azúcares precursores de hialuronano se suministran a la célula huésped, bien al medio de cultivo, o siendo codificados por genes endógenos, por genes no endógenos, o por una combinación de genes no endógenos y endógenos en la célula huésped de *Bacillus*. El azúcar precursor puede ser ácido D-glucurónico o N-acetil-glucosamina.

30

[0035] En los métodos de la presente invención, el constructo de ácidos nucleicos puede comprender además uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis de un azúcar precursor de un hialuronano. Alternativamente, la célula huésped de *Bacillus* puede comprender además uno o más segundos constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis del azúcar precursor. La producción de hialuronano se mejora por el uso de constructos con una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias que codifican un gen o genes que dirigen una fase en la vía de síntesis del azúcar precursor de hialuronano. Por, "dirigir una fase en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano" se entiende que la proteína expresada del gen es activa en la formación de N-acetil-glucosamina o ácido D-glucurónico, o un azúcar que es un precursor de cualquiera de N-acetil-glucosamina y ácido D-glucurónico (Figura 2).

35

[0036] En un método preferido para suministrar azúcares precursores, los constructos se proveen para mejorar la producción de hialuronano en una célula huésped con una hialuronano sintasa, por cultivo de una célula huésped con un

40

constructo recombinante con una región de promotor heteróloga operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige una fase en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano. En un método preferido la célula huésped también comprende un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a una hialuronano sintasa, que puede usar la misma o una región de promotor diferente que la secuencia de ácidos nucleicos a una sintasa implicada en la biosíntesis de N-acetil-glucosamina. En otra forma de realización preferida, la célula huésped puede tener un constructo recombinante con una región de promotor operativamente enlazada a secuencias de ácidos nucleicos diferentes que codifican un segundo gen implicado en la síntesis de un azúcar precursor de hialuronano.

[0037] Así, la presente invención también se refiere a constructos para mejorar la producción de hialuronano por el uso de constructos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige una fase en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano. La secuencia de ácidos nucleicos al azúcar precursor se puede expresar a partir del mismo o un promotor diferente que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronano sintasa.

[0038] Los genes implicados en la biosíntesis de azúcares precursores para la producción de ácido hialurónico incluyen un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, gen de UDP-glucosa pirofosforilasa, gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa, gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amidotransferasa, gen de mutasa, y gen de acetil transferasa.

[0039] En una célula con una hialuronano sintasa, cualquiera o una combinación de dos o más de hasB, hasC y hasD, o sus homólogos, tales como tuaD, gtaB, y gcaD de *Bacillus subtilis*, respectivamente, al igual que hasE, se pueden expresar para aumentar los depósitos de azúcares precursores disponibles para la hialuronano sintasa. El genoma de *Bacillus* es descrito en Kunst, et al., Nature 390, 249-256, "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*" (20 Noviembre 1997). En algunos ejemplos, tales como donde la célula huésped no tiene una actividad de hialuronano sintasa nativa, el constructo puede incluir el gen hasA.

[0040] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las enzimas biosintéticas puede ser nativa a la célula huésped, mientras en otros casos se puede utilizar una secuencia heteróloga. Si dos o más genes son expresados ellos pueden ser genes que se asocian unos con otros en un operón nativo, tales como los genes del operón HAS de *Streptococcus equisimilis*, que comprenden hasA, hasB, hasC y hasD. En otros ejemplos, el uso de alguna combinación de las secuencias de gen precursor puede ser deseado, sin cada elemento del operón incluido. El uso de algunos genes nativos a la célula huésped, y otros que son exógenos pueden también ser preferidos en otros casos. La elección dependerá de los depósitos disponibles de azúcares en una célula huésped, la capacidad de la célula para alojar sobreproducción sin interferencia con otras funciones de la célula huésped, y si la célula regula la expresión de sus genes nativos diferentemente que los genes exógenos.

[0041] Como un ejemplo, dependiendo de los requisitos metabólicos y condiciones de crecimiento de la célula, y los depósitos de azúcar de precursores disponibles, puede ser deseable aumentar la producción de N-acetil-glucosamina por expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-N-acetil-glucosamina pirofosforilasa, tal como el gen hasD, el gen gcaD de *Bacillus*, y homólogos de los mismos. Alternativamente, el azúcar precursor puede ser ácido D-glucurónico. En una tal forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen el gen tuaD de *Bacillus*, el gen hasB de *Streptococcus*, y homólogos de los

mismos. La secuencia de ácidos nucleicos puede también codificar UDP- pirofosforilasa de glucosa, tal como en el gen *gtaB* de *Bacillus*, el gen *hasC* de *Streptococcus*, y homólogos de los mismos.

5 [0042] En los métodos de la presente invención, el gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa puede ser un gen *hasB* o gen *tuaD*; u homólogos de los mismos.

10 [0043] En una forma de realización preferida, el gen *hasB* es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID nº: 40, SEC ID Nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

15 [0044] En una forma de realización más preferida, el gen *hasB* codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 o un fragmento de la misma que tiene actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa.

20 [0045] En otra forma de realización preferida, el gen *tuaD* es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID nº: 12 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID nº: 11 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

25 [0046] En otra forma de realización más preferida, el gen *tuaD* codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 12, o un fragmento de la misma que tiene actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa.

[0047] En los métodos de la presente invención, el gen de UDP-glucosa pirofosforilasa puede ser un gen *hasC* o gen *gtaB*; u homólogos de los mismos.

30 [0048] En una forma de realización preferida, el gen *hasC* es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% identidad a SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106; y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

35

[0049] En otra forma de realización más preferida, el gen *hasC* codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 43 o SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 o un fragmento de la misma que tiene actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa.

40

[0050] En otra forma de realización preferida, el gen *gtaB* es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de

ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID n°: 22 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID n°: 21 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

5

[0051] En otra forma de realización más preferida, el gen gtaB codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 22, o un fragmento de la misma que tiene actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa.

[0052] En los métodos de la presente invención, el gen UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa puede ser el gen hasD o gcaD; u homólogos de los mismos.

10

[0053] En una forma de realización preferida, el gen hasD es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID n°: 45 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID n°: 44 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

15

[0054] En otra forma de realización más preferida, el gen hasD codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 45, o un fragmento de la misma que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

20

[0055] En otra forma de realización preferida, el gen gcaD es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID n°: 30 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID n°: 29 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

25

[0056] En otra forma de realización más preferida, el gen gcaD codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 30, o un fragmento de la misma que tiene actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

30

[0057] En los métodos de la presente invención, el gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa puede ser un hasE u homólogo del mismo.

[0058] En una forma de realización preferida, el gen hasE es seleccionado del grupo que consiste en (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% de identidad a SEC ID n°: 101 (b) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia baja, media o alta con SEC ID n°: 100 y (c) una cadena complementaria de (a) o (b).

35

[0059] En otra forma de realización más preferida, el gen hasE codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 101, o un fragmento de la misma que tiene actividad de glucosa-6-fosfato-isomerasa.

40

[0060] En los métodos de la presente invención, el gen de hialuronano sintasa y uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor. Alternativamente, uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor pero un promotor diferente que dirige el gen de hialuronano sintasa. Otra alternativa es que el gen de hialuronano sintasa y cada uno de los genes que codifican un azúcar precursor estén bajo el control de diferentes promotores. En una forma de realización preferida, el gen de hialuronano sintasa y uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor.

[0061] La presente invención también se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un operón de hialuronano sintasa que comprende un gen de hialuronano sintasa y un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, y opcionalmente uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de UDP-glucosa pirofosforilasa, gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, y gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la mayor parte del operón de hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis* se encuentra en SEC ID n°: 108. Esta secuencia contiene los homólogos hasB (SEC ID n°: 40) y hasC (SEC ID n°: 42) del gen tuaD de *Bacillus subtilis* (SEC ID n°: 11) y gen gtaB (SEC ID n°: 21), respectivamente, como es el caso para *Streptococcus pyogenes*, al igual que un homólogo del gen gcaD (SEC ID n°: 29), que ha sido designado hasD (SEC ID n°: 44). gcaD de *Bacillus subtilis* codifica UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, que se implica en la síntesis de N-acetil-glucosamina, uno de los dos azúcares de hialuronano. El homólogo de *Streptococcus equisimilis* de gcaD, hasD, se dispone por *Streptococcus equisimilis* en el operón de hialuronano sintasa. La secuencia de ácidos nucleicos también contiene una parte del gen hasA (los últimos 1156 bp de SEC ID n°: 1).

[0062] En algunos casos la célula huésped tendrá un constructo recombinante con una región de promotor heteróloga operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige una fase en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano, que puede estar coordinado con la expresión de hialuronano sintasa de un constructo recombinante. La hialuronano sintasa se puede expresar a partir de la misma región o una diferente del promotor que la de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima implicada en la biosíntesis del precursor. En otra forma de realización preferida, la célula huésped puede tener un constructo recombinante con una región del promotor operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos diferente que codifica un segundo gen implicado en la síntesis de un azúcar precursor de hialuronano.

[0063] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las enzimas implicadas en la biosíntesis del(los) azúcar(es) precursor(es) puede ser expresada del mismo o un promotor diferente que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronano sintasa. En el sentido anterior, "operones artificiales" son construidos, que pueden imitar el operón de *Streptococcus equisimilis* en tener cada hasA, hasB, hasC y hasD, u homólogos de los mismos, o, alternativamente, puede utilizar menos que el complemento completo presente en el operón de *Streptococcus equisimilis*. Los operones artificiales" pueden también comprender un gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa (hasE) al igual que uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amidotransferasa, gen de mutasa, y gen de acetil transferasa. En el operón artificial, al menos uno de los elementos es heterólogo a otro de los elementos, tal como la región del promotor siendo heteróloga a las secuencias codificantes.

[0064] En una forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, tuaD, y gtaB. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, tuaD, gtaB, y gcaD. En otra forma de

realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA y tuaD. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, tuaD, gtaB, gcaD, y hasE. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, hasB, hasC, y hasD. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, hasB, hasC, hasD, y hasE. Basado en las formas de realización anteriores preferidas, los genes indicados se pueden sustituir con homólogos de los mismos.

[0065] En los métodos de la presente invención, los constructos de ácidos nucleicos comprenden una secuencia codificante de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia del promotor foránea a la secuencia codificante de hialuronano sintasa. La secuencia del promotor puede ser, por ejemplo, un único promotor o un promotor en serie.

[0066] "Promotor" es definido aquí como una secuencia de ácidos nucleicos implicada en la unión de ARN-polimerasa dirigida por ADN para iniciar la transcripción de un gen. "Promotor tándem" se define aquí como dos o más secuencias de promotor cada una de las cuales es operativamente enlazada a una secuencia codificante y median la transcripción de la secuencia codificante en ARNm. "Operativamente enlazada" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control, por ejemplo, una secuencia del promotor, es apropiadamente colocada en una posición con respecto a una secuencia codificante de manera que la secuencia de control dirige la producción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante. Como se ha indicado anteriormente, una "secuencia codificante" es definida aquí como una secuencia de ácidos nucleicos que es transcrita en ARNm y traducida en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de las secuencias de control apropiadas. Los bordes de la secuencia codificante son generalmente determinados por un sitio de unión al ribosoma localizado justo arriba del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia del terminador de transcripción localizada justo debajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, secuencias de ADN genómico, ADNc, semisintéticas, sintéticas, y de ácidos nucleicos recombinantes.

[0067] En una forma de realización preferida, las secuencias del promotor se pueden obtener de una fuente bacteriana. En una forma de realización más preferida, las secuencias del promotor se pueden obtener de una bacteria Gram positiva tal como una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa de *Bacillus agaradherens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *pumilus del bacillus*, *Bacillus stearothermophilus*, *bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o de una bacteria gram negativa, por ejemplo, *E. coli* o *Pseudomonas sp.*

[0068] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos en los métodos de la presente invención son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gen de proteasa alcalina de *Bacillus lentus* o *Bacillus clausii* (*aprH*), gen de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (gen de subtilisina Carlsberg), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* (*amyE*), gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *CryIIIA* (*cryIIIA*) de *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis* o partes del mismo, gen de beta-lactamasa procarriótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of

Sciences USA 75: 3727-3731). Otros ejemplos son el promotor del promotor de fago bacteriano *spo1* y el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25). Más promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242:74-94; y en Sambrook, Fritsch, and Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York.

5

[0069] El promotor puede también ser un promotor de "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". El promotor de consenso se puede obtener de cualquier promotor que puede funcionar en la célula huésped de *Bacillus*. La construcción de un promotor de "consenso" se puede realizar por mutagénesis dirigida para crear un promotor que conforma más perfectamente a las secuencias de consenso establecidas para las regiones "-35" y "-10" de los promotores vegetativos "tipo sigma A" para *Bacillus subtilis* (Voskuil et al., 1995, Molecular Microbiology 17: 271-279).

10

[0070] En una forma de realización preferida, el promotor de "consenso" se obtiene de un promotor obtenido del operón *lac* de *E. coli*, gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, gen de proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus clausii* o *Bacillus lentus*, gen de proteasa alcalina (gen de subtilisina Carlsberg) de *Bacillus licheniformis*, gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (*amyE*) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de penicilinasa (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *CryIII A* (*cryIII A*) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* o partes de los mismos, o promotor de fago bacteriano del gen de beta-lactamasa procariótica *spo1*. En una forma de realización más preferida, el promotor de "consenso" se obtiene del gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*.

15

20

[0071] Widner, et al., patentes estadounidenses Nos. 6,255,076 y 5,955,310, describen promotores en serie y constructos y métodos para el uso en la expresión en células de *Bacillus*, incluido el promotor de consenso corto de *amyQ* (también llamado scBAN). El uso de la secuencia estabilizadora de *cryIII A*, y constructos que usan la secuencia, para la producción mejorada en *Bacillus* son también descritos en ésta.

25

[0072] Cada secuencia del promotor del promotor tándem puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestra actividad transcripcional en la célula de *Bacillus* de elección que incluye un mutante truncado, y promotor híbrido, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula de *Bacillus*. Cada secuencia del promotor puede ser nativa o foránea a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido y foránea o nativa a la célula de *Bacillus*. Las secuencias del promotor pueden ser la misma secuencia del promotor o secuencias de promotor diferentes.

30

[0073] Las dos o más secuencias del promotor del promotor tándem pueden simultáneamente promover la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos. Alternativamente, una o más de las secuencias promotoras del promotor tándem puede promover la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos a estadios diferentes de crecimiento de la célula de *Bacillus*.

35

[0074] En una forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de *amyQ* del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos un promotor de "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". En otra forma de realización preferida, el promotor en serie contiene al menos el promotor de *amyL* del gen de alfa-amilasa de *Bacillus*

40

licheniformis. En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de *cryIIIA* o partes del mismo (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107).

[0075] En una forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de *amyL* y el promotor de *cryIIIA*. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de *amyQ* y el promotor de *cryIIIA*. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos un promotor de "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10" y el promotor de *cryIIIA*. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor de *amyL*. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor de *amyQ*. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias de un promotor de "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor de *cryIIIA* .

[0076] "Una secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm" se define aquí como una secuencia localizada debajo de una o más secuencias del promotor y en dirección ascendente de una secuencia codificante a lo que cada una de una o más secuencias del promotor son operativamente enlazadas de manera que todos los ARNm sintetizados de cada secuencia del promotor se pueden procesar para generar transcritos de ARNm con una secuencia estabilizadora en el extremo 5' de los transcritos. La presencia de tal secuencia estabilizadora en el extremo 5' de los transcritos de ARNm aumenta su vida media (Agaisse y Lereclus, 1994, supra, Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471). La secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es complementaria a la extremidad 3' de un ARN ribosómico 16S bacteriano. En una forma de realización preferida, la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm genera transcritos esencialmente individuales con una secuencia estabilizadora en el extremo 5' de los transcritos. La secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es preferiblemente una, que es complementaria a la extremidad 3' de un ARN ribosómico 16S bacteriano. Véase patentes estadounidenses Nos. 6,255,076 y 5,955,310.

[0077] En una forma de realización más preferida, la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm de *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* descrita en WO 94/25612 y Agaisse y Lereclus, 1994, o partes de la misma que retienen la función procesadora/estabilizadora de ARNm. En otra forma de realización más preferida, la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm SP82 de *Bacillus subtilis* descrita en Hue et al., 1995, supra, o partes de la misma que retienen la función procesadora/estabilizadora de ARNm.

[0078] Cuando el promotor *cryIIIA* y su secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm se emplean en los métodos de la presente invención, un fragmento de ADN con la secuencia descrita en WO 94/25612 y Agaisse y Lereclus, 1994, supra, o partes del mismo que retienen las funciones procesadoras/estabilizadoras de ARNm y del promotor, pueden ser utilizados. Además, fragmentos de ADN conteniendo sólo el promotor *cryIIIA* o sólo la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm de *cryIIIA* pueden ser preparados usando métodos bien conocidos en la técnica para construir varios promotores tándem y combinaciones de secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm. En esta forma de realización, el promotor *cryIIIA* y su secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm son preferiblemente colocados en sentido descendente de la otra secuencia(s) del promotor que constituye el promotor tándem y en sentido ascendente de la secuencia codificante del gen de interés.

[0079] La secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la(s) enzima(s) deseada(s) implicada(s) en la producción de ácido hialurónico puede luego ser manipulada para mejorar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La expresión será entendida para incluir cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de clonación se conocen bien en la técnica.

[0080] Un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima puede ser operativamente enlazado a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la secuencia codificante en una célula de *Bacillus* bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0081] El término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de la secuencia codificante de una secuencia de ácidos nucleicos. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima. Además de las secuencias promotoras anteriormente descritas, tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia señal, y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada traduccional y transcripcional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlazadores para introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima.

[0082] La secuencia de control puede también ser una secuencia del terminador de transcripción adecuado, una secuencia reconocida por una célula de *Bacillus* para terminar la transcripción. La secuencia del terminador es operativamente enlazada al extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima o la última enzima de un operón. Cualquier terminador que es funcional en la célula de *Bacillus* de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0083] La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula de *Bacillus*. La secuencia líder es operativamente enlazada al término 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula de *Bacillus* de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0084] La secuencia de control puede también ser una región codificante del péptido señal, que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al término amino de un polipéptido que puede dirigir el polipéptido expresado en la vía secretora de la célula. La región codificante del péptido señal puede ser nativa al polipéptido o se puede obtener de fuentes foráneas. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede intrínsecamente contener una región codificante del péptido señal naturalmente enlazado en marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es foránea a la parte de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. La región codificante del péptido señal foránea puede ser requerida cuando la secuencia codificante normalmente no contiene una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para obtener una secreción mejorada del polipéptido con respecto a la región codificante del péptido señal natural normalmente asociada a la secuencia

codificante. La región codificante del péptido señal se puede obtener de una amilasa o un gen de proteasa de una especie de *Bacillus*. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal capaz de dirigir el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula de *Bacillus* de elección se puede utilizar en la presente invención.

5 [0085] Una región codificante del péptido señal eficaz para células de *Bacillus* es la región codificante del péptido señal obtenida del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, el gen de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de subtilisina de *Bacillus licheniformis*, el gen de beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, los genes de proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y el gen *prsA* de *Bacillus subtilis*. Más péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57:109-137.

10 [0086] La secuencia de control puede también ser una región codificante del propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el término amino de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido maduro activo por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*) y proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*.

15 [0087] Cuando tanto las regiones del péptido señal y del propéptido están presentes en el término amino de un polipéptido, la región del propéptido está situada junto al término amino de un polipéptido y la región del péptido señal está situada junto al término amino de la región del propéptido.

20 [0088] Puede también ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que provocan la activación o la desactivación de la expresión del gen en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas de operador *lac*, *tac*, y *trp*.

Vectores de expresión

25 [0089] En los métodos de la presente invención, un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, un promotor, y señales de parada traduccional y transcripcional se pueden utilizar para la producción recombinante de una enzima implicada en la producción de ácido hialurónico. Las distintas secuencias de ácidos nucleicos y de control anteriormente descritas puede ser unidas entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o enzima en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos se puede expresar por inserción de la secuencia de ácidos nucleicos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante es operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión, y posiblemente la secreción.

35 [0090] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula de *Bacillus* en que el vector debe ser introducido.

Los vectores pueden ser plásmidos lineales o cerrados circulares. El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula de *Bacillus*, se integra en el genoma y se replica con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado. El sistema del vector puede ser un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que debe ser introducido en el genoma de la célula de *Bacillus*, o un transposón puede ser utilizado.

[0091] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped de *Bacillus* o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0092] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula de *Bacillus*. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten que el vector sea integrado en el genoma celular de *Bacillus* en una ubicación precisa en el cromosoma. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 1,500 pares de bases, preferiblemente 400 a 1,500 pares de bases, y de la forma más preferible 800 a 1,500 pares de bases, que son altamente homólogos a la secuencia blanco correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia blanco en el genoma de la célula de *Bacillus*. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de ácidos nucleicos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0093] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula de *Bacillus* en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pUB110; pE194; pTA1060, y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*. El origen de replicación puede ser uno con una mutación para hacer su función termosensible en la célula de *Bacillus* (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1433).

[0094] Los vectores preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a los biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a los antibióticos tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, la selección se puede realizar por cotransformación, por ejemplo, como se describe en WO 91/09129, donde el marcador seleccionable está sobre un vector separado.

[0095] Más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos se puede insertar en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de ácidos nucleicos se puede

obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen de marcador seleccionable amplificable con la secuencia de ácidos nucleicos donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente apropiado seleccionable. Un método conveniente para

5 lograr la amplificación de secuencias de ADN genómico se describe en WO 94/14968.

[0096] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes son conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

10 **Producción**

[0097] En los métodos de la presente invención, las células huéspedes de *Bacillus* se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del ácido hialurónico usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en un matraz de agitación, fermentación a gran escala o pequeña escala (incluyendo, fermentaciones continuas, discontinuas, por lote alimentado, o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en

15 un medio adecuado y bajo condiciones que permiten a las enzimas implicadas en la síntesis de ácido hialurónico ser expresadas y aislar el ácido hialurónico. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). El ácido hialurónico segregado se puede recuperar directamente del medio.

20 [0098] El ácido hialurónico resultante se puede aislar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido hialurónico puede ser aislado del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. El ácido hialurónico aislado puede luego ser además purificado por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a,

25 cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, por cromatoenfoco, y por exclusión de tamaños), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

30 [0099] En los métodos de la presente invención, las células huéspedes de *Bacillus* producen más de aproximadamente 4 g, preferiblemente más de aproximadamente 6 g, más preferiblemente más de aproximadamente 8 g, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 10 g, y de la forma más preferible más de aproximadamente 12 g de ácido hialurónico por litro.

35 **Deleciones/interrupciones**

[0100] Técnicas de delección génica o de sustitución se pueden utilizar para la eliminación completa de un gen marcador seleccionable u otro gen indeseable. En tales métodos, la delección del gen marcador seleccionable se puede realizar por recombinación homóloga usando un plásmido que ha sido construido para contener de forma contigua las regiones 5' y 3' que flanquean el gen marcador seleccionable. Las regiones 5' y 3' contiguas se pueden introducir en una célula de *Bacillus*

40 en un plásmido termosensible, por ejemplo, pE194, en asociación con un segundo marcador seleccionable a una temperatura permisiva para permitir al plásmido establecerse en la célula. La célula es luego desplazada a una temperatura

no permisiva para seleccionar células que tienen el plásmido integrado en el cromosoma en una de las regiones flanqueantes homólogas. La selección para la integración del plásmido se efectúa por selección para el segundo marcador seleccionable. Después de la integración, un evento de recombinación en la segunda región flanqueante de homólogos se estimula por desplazamiento de las células a la temperatura permisiva para diferentes generaciones sin selección. Las

5 células se colocan en placas para obtener colonias individuales y las colonias se examinan para pérdida de ambos marcadores seleccionables (véase, por ejemplo, Perego, 1993, En A.L. Sonneshein, J.A. Hoch, y R. Losick, editors, *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, Chapter 42, American Society of Microbiology, Washington, D.C., 1993).

[0101] Un gen marcador seleccionable puede también ser quitado por recombinación homóloga por introducción en la célula mutante de un fragmento de ácido nucleico que comprende regiones 5' y 3' del gen defectuoso, pero careciendo del gen marcador seleccionable, seguido de selección en el medio de contraselección. Por recombinación homóloga, el gen defectuoso que contiene el gen marcador seleccionable se sustituye con el fragmento de ácido nucleico que carece del gen marcador seleccionable. Otros métodos conocidos en la técnica pueden también ser usados.

15 [0102] Patente estadounidense n.º. 5,891,701 divulga técnicas para eliminar diferentes genes que incluyen *spoIIAC*, *aprE*, *nprE*, y *amyE*.

[0103] Otros compuestos indeseables biológicos pueden también ser eliminados por los métodos descritos anteriormente tales como el pigmento rojo sintetizado por *cypX* (n.º de registro BG12580) y/o *yvmC* (n.º de registro BG14121).

20 [0104] En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* se desmarca con cualquier marcador seleccionable exógeno o heterólogo. En otra forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* no produce ningún pigmento rojo sintetizado por *cypX* y *yvmC*.

25 **Secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican polipéptidos con actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa, o actividad de UDP-N-Acetilglucosamina pirofosforilasa**

[0105] El término "actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa" se define aquí como una actividad de UDP glucosa:NAD⁺ 6-oxidoreductasa que cataliza la conversión de UDP-glucosa en presencia de 2NAD⁺ y agua a UDP-glucuronato y 2NADH. Para objetivos de la presente invención, la actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa se determina según el

30 procedimiento descrito por Jaenicke y Rudolph, 1986, *Biochemistry* 25: 7283-7287. Una unidad de actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es definida como 1.0 μmol de UDP-glucuronato producido por minuto a 25°C, pH 7.

[0106] El término "actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa" es definido aquí como UTP: actividad de -D-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa que cataliza la conversión de glucosa-1-fosfato en presencia de UTP a difosfato y UDP-glucosa. Para

35 objetivos de la presente invención, la actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa se determina según el procedimiento descrito por Kamogawa et al., 1965, *J. Biochem. (Tokio)* 57: 758-765 o Hansen et al., 1966, *Method Enzymol.* 8: 248-253. Una unidad de actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa es definida como 1.0 μmol de UDP-glucosa producida por minuto a 25°C, pH 7.

40 [0107] El término "actividad de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa" es definido aquí como una actividad de UTP: N-acetil-alfa-D-glucoamina-1-fosfato uridililtransferasa que cataliza la conversión de N-acetil-alfa-D-glucoamina-1-fosfato en

presencia de UTP a difosfato y UDP-N-acetil-alfa-d-glucoamina. Para objetivos de la presente invención, actividad de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa se determina según el procedimiento descrito por Mangin-Lecreux et al., 1994, J. Bacteriology 176: 5788-5795. Una unidad de actividad de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa es definida como 1.0 μ mol de UDP-N-acetil-alfa-D-glucoamina producido por minuto a 25°C, pH 7.

5

[0108] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" como se utiliza en este caso se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, es al menos aproximadamente 20% pura, preferiblemente al menos aproximadamente 40% pura, más preferiblemente al menos aproximadamente 60%, pura incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80% pura, y de la forma más preferible al menos aproximadamente 90% pura según se ha determinado por electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándares usados en ingeniería genética para relocalar la secuencia de ácidos nucleicos desde su ubicación natural a un sitio diferente donde ésta será reproducida. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde múltiples copias o clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán replicadas. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético sintético, o cualquier combinación de los mismos.

20

[0109] En una primera forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad a la SEC ID n°: 41 de al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de la forma más preferible al menos aproximadamente 95%, e incluso de la forma más preferible al menos aproximadamente 97%, que tienen actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). En una forma de realización preferida, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de cinco aminoácidos, preferiblemente de cuatro aminoácidos, más preferiblemente de tres aminoácidos, incluso más preferiblemente de dos aminoácidos, y de la forma más preferible de un aminoácido de SEC ID n°: 41.

25

[0110] En otra primera forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican polipéptidos con una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad a SEC ID n°: 43 de al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 97%, con actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). En una forma de realización preferida, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de cinco aminoácidos, preferiblemente de cuatro aminoácidos, más preferiblemente de tres aminoácidos, incluso más preferiblemente de dos aminoácidos, y de la forma más preferible de un aminoácido de SEC ID n°: 43.

35

[0111] En otra primera forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad a SEC ID n°: 45 de al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de la forma más preferible al menos aproximadamente 95%, e incluso de la forma más preferible al menos aproximadamente 97%, con actividad de UDP-N-acetilglucosamina

40

pirofosforilasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). En una forma de realización preferida, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de cinco aminoácidos, preferiblemente de cuatro aminoácidos, más preferiblemente de tres aminoácidos, incluso más preferiblemente de dos aminoácidos, y de la forma más preferible de un aminoácido de SEC ID n°: 45.

5

[0112] Para objetivos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el paquete de software Vector NTI AlignX (Informax Inc., Bethesda, MD) con los siguientes valores predeterminados: alineación de pares, penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.1, y matriz de puntuación: blosum62mt2.

10

[0113] Preferiblemente, las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención codifican polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma con actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, respectivamente. En una forma de realización más preferida, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45. En otra forma de realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma, donde el fragmento de polipéptido tiene actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, respectivamente.

15

20

En otra forma de realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45.

[0114] La presente invención también comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45, que difieren de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44 en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44 que codifican fragmentos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45, respectivamente, que tienen actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, respectivamente.

25

30

[0115] Una subsecuencia de SEC ID n°: 40 es una secuencia de ácidos nucleicos comprendida por SEC ID n°: 40 a excepción de que uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' ha sido eliminado. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 1020 nucleótidos, más preferiblemente al menos 1080 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 1140 nucleótidos. Un fragmento de SEC ID N°: 41 es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados del término amino y/o carboxi de esta secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 340 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 360 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 380 residuos de aminoácidos.

35

[0116] Una subsecuencia de SEC ID n°: 42 es una secuencia de ácidos nucleicos comprendida por SEC ID n°: 42 a excepción de que uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' ha sido eliminado. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 765 nucleótidos, más preferiblemente al menos 810 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 855 nucleótidos. Un fragmento de SEC ID n°: 43 es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados del término amino

40

y/o carboxi de esta secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 255 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 270 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 285 residuos de aminoácidos.

5 [0117] Una subsecuencia de SEC ID n°: 44 es una secuencia de ácidos nucleicos comprendida por SEC ID n°: 44 a excepción de que uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' ha sido eliminado. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 1110 nucleótidos, más preferiblemente al menos 1200 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 1290 nucleótidos. Un fragmento de SEC ID n°: 45 es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados del término amino y/o carboxi de esta secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 370 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 400 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 430
10 residuos de aminoácidos.

[0118] Una variante alélica denota cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede suponer polimorfismo dentro de
15 poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. La variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0119] En una segunda forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que
20 tienen un grado de homología a SEC ID n°: 40 de al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de la forma más preferible al menos aproximadamente 95%, e incluso de la forma más preferible al menos aproximadamente 97%.

25 [0120] En otra segunda forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que tienen un grado de homología a SEC ID n°: 42 de al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 97%.

[0121] En otra segunda forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que
30 tienen un grado de homología a SEC ID n°: 44 de al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de la forma más preferible al menos aproximadamente 95%, e incluso de la forma más preferible al menos aproximadamente 97%.

35 [0122] Para objetivos de la presente invención, el grado de homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina por el paquete de software Vector NTI AlignX (Informax Inc., Bethesda, MD) usando los siguientes valores predeterminados: alineación de pares, penalización de abertura de espacio de 15, penalización de extensión de espacio de 6.6, y matriz de puntuación: swgapdnamt.

40 [0123] En una tercera forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican polipéptidos con actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-

acetilglucosamina pirofosforilasa, que se hibridan bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia preferiblemente baja, más preferiblemente condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia más preferiblemente media alta, condiciones de astringencia incluso más preferiblemente alta, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). La subsecuencia de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44 puede ser al menos de 100 nucleótidos o preferiblemente al menos de 200 nucleótidos. Por otra parte, la subsecuencia respectiva puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

[0124] La secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44, o subsecuencias de las mismas, al igual que la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45, o un fragmento de la misma, se puede utilizar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar polipéptidos codificantes de ADN con actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, respectivamente, de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especies de interés, según procedimientos de Southern blot estándares, para identificar y aislar el gen correspondiente en las mismas. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían tener al menos 15, preferiblemente al menos 25, y más preferiblemente al menos 35 nucleótidos de longitud. Sondas más largas pueden también ser usadas. Ambas sondas de ADN y ARN pueden ser usadas. Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina). Tales sondas son comprendidas por la presente invención.

[0125] Así, un ADN genómico o genoteca de ADNc obtenida a partir de tales otros organismos se pueden seleccionar para ADN que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa. ADN genómico u otro ADN de tales otros organismos se pueden separar por electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir a e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44, o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en un Southern blot. Para objetivos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de ácidos nucleicos se hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada correspondiente a la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44, su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos se hibrida bajo estas condiciones son detectadas usando película radiográfica.

[0126] En una forma de realización preferida, la sonda de ácidos nucleicos es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45 o una subsecuencia de la misma. En otra forma de realización preferida, la sonda de ácidos nucleicos es SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44. En otra forma de realización preferida, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia de ácidos nucleicos contenida en el plásmido pMRT106 que es contenida en *Escherichia coli* NRRL B-30536, donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica polipéptidos con

actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, y UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa.

[0127] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia muy baja a muy alta son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado, y bien 25% de formamida para astringencias bajas y muy bajas, 35% formamida para astringencias medias y medias altas, o 50% de formamida para astringencias muy altas y altas, según procedimientos de Southern blot estándares.

[0128] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada una durante 15 minutos usando 2 x SSC, 0.2% SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y de la forma más preferible al menos a 70°C (astringencia muy alta).

[0129] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y post-hibridación de lavado a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (11962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0.9 M NaCl, 0.09 M Tris-HCl pH 7.6, 6 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato monobásico de sodio, 0.1 mM ATP, y 0.2 mg de ARN de levadura por ml según procedimientos de Southern blot estándares.

[0130] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0.1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0131] En una cuarta forma de realización, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican variantes del polipéptido con una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más aminoácidos.

[0132] Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos variantes pueden diferir de la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 43, o SEC ID n°: 45, por una inserción o delección de uno o más residuos de aminoácidos y/o la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos diferentes. Preferiblemente, cambios aminoácidos son de una naturaleza menor, de lo que lo son las sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al doblamiento y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxiloterminales, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido de enlace de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0133] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina y histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos

pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Los cambios que ocurren más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly al igual que estos a la inversa.

5

[0134] La modificación de una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similar al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas de origen no natural del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna vía creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en actividad específica, termostabilidad, pH óptimo, o similar. La secuencia variante puede ser construida basándose en la secuencia de ácidos nucleicos presentada como la parte codificante del polipéptido de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada por la secuencia de ácidos nucleicos, pero que corresponde al uso de codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que puede dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

10

15

[0135] Será aparente para los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden ser hechas fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y todavía resultan en un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificados por la secuencia de ácidos nucleicos aislada de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta técnica, se introducen mutaciones en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para la actividad enzimática para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción de enzima-sustrato pueden también ser determinados por análisis de la estructura tridimensional como se determina por técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcado por fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

20

25

30

[0136] Los polipéptidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos aisladas de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, y de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa del polipéptido de SEC ID n°: 41, la actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa del polipéptido de SEC ID n°: 43, o la actividad de UDP-N- acetilglucosamina pirofosforilasa del polipéptido de SEC ID n°: 45.

35

[0137] Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden obtener de microorganismos de cualquier género. Para objetivos de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos se produce por la fuente o por una célula en la que la secuencia de ácidos nucleicos de la fuente ha sido insertada. En una forma de realización preferida, el polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención es segregado extracelularmente.

40

[0138] Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden obtener de una fuente bacteriana. Por ejemplo, estos polipéptidos se pueden obtener de una bacteria gram positiva tal como una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus agaradherens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o una cepa de *Streptomyces*, p. ej. *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o de una bacteria gram negativa, p.ej., *E. coli* o *Pseudomonas sp.*

[0139] En una forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos se obtienen de una cepa de *Streptococcus* o *Pastuerella*.

[0140] En una forma de realización más preferida, las secuencias de ácidos nucleicos se obtienen de una cepa de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi* subs. *zooepidemicus*, o una cepa de *Pasteurella multocida*.

[0141] En una forma de realización más preferida, las secuencias de ácidos nucleicos se obtienen de *Streptococcus equisimilis*, por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44. En otra forma de realización más preferida, la secuencia de ácidos nucleicos es la secuencia contenida en el plásmido pMRT106 que está contenido en *Escherichia coli* NRRL B-30536. En otra forma de realización más preferida, la secuencia de ácidos nucleicos es SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, o SEC ID n°: 44.

[0142] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0143] Además, tales secuencias de ácidos nucleicos se pueden identificar y obtener de otros microorganismos que incluyen fuentes aisladas de la naturaleza (p. ej., tierra, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas arriba. Técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos puede luego ser derivada seleccionando de forma similar ADN genómico o genoteca de ADNc de otro microorganismo. Una vez una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido ha sido detectada con la(s) sonda(s), la secuencia puede ser aislada o clonada utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

[0144] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos mutantes que comprenden al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido de SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 42, y SEC ID n°: 44, en el que la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en SEC ID n°: 42, SEC ID n°: 43, y SEC ID n°: 45, respectivamente.

[0145] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de los mismos. La

clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida o selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) pueden ser utilizados. La secuencia de ácidos nucleicos se puede clonar de una cepa de *Streptococcus*, u otro o organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región codificante del polipéptido de la secuencia de ácidos nucleicos.

10 [0146] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

15 [0147] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, un promotor, y señales de parada traduccional y transcripcional.

[0148] La presente invención también se refiere a células huéspedes recombinantes, que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, que es ventajosamente usada en la producción recombinante de los polipéptidos.

20 [0149] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido con actividad UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa que comprende (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones adecuadas para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

25 [0150] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, y fermentación a gran escala o pequeña escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, por lote alimentado, o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido ser expresado y/o aislado. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, éste se puede recuperar de lisatos celulares.

35 [0151] Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

40 [0152] El polipéptido resultante se puede recuperar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede

ser recuperado del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

5 [0153] Los polipéptidos se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, por cromatoenfoco, y por exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

10 [0154] La presente invención además se refiere a los polipéptidos aislados con actividad de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, de UDP-glucosa pirofosforilasa, o de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa codificada por las secuencias de ácidos nucleicos anteriormente descritas.

15 [0155] La presente invención es posteriormente descrita por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Cebadores y Oligos

[0156] Todos los cebadores y oligos fueron comprados (MWG Biotech Inc., High Point, NC)

20

Ejemplo 1: Amplificación por PCR y clonación del gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* y genes *tuaD*, *gtaB*, y *gcaD* de *Bacillus subtilis*

[0157] El gen de hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis* (*hasA*, número de acceso AF023876, SEC ID NOs: 1 [secuencia de ADN] y 2 [secuencia de aminoácido deducida]) fue amplificado por PCR de plásmido pKKseD (Weigel, 1997, Journal of Biological Chemistry 272: 32539-32546) usando cebadores 1 y 2:

25

Cebador 1:

5'-GAGCTCTATAAAAATGAGGAGGGAACCGAATGAGAACATTAACCT-3' (SEC ID n°: 3)

Cebador 2:

5'-GTTAACGAATTCAGCTATGTAGGTACCTTATAATAATTTTACGTGT-3' (SEC ID n°: 4)

30

[0158] Amplificaciones por PCR fueron realizadas por triplicado en reacciones de 50 μ l compuestas por 1 ng de pKKseD ADN, 0.4 μ M cada uno de los cebadores 1 y 2, 200 μ M cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con 2.5 mM $MgCl_2$, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) programado para 1 ciclo a 95°C durante 9 minutos; 3 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 52°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; 27 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. El producto de PCR fue visualizado usando un 0,8% de gel de agarosa con 44 mM Tris Base, 44 mM ácido bórico, 0.5 mM tampón de EDTA (0.5X TBE). El fragmento previsto fue aproximadamente de 1200 par de bases.

40

[0159] El fragmento de PCR de 1200 bp fue clonado en pCR2.1 usando el kit de clonación TA-TOPO (Stratagene, Inc., La

Jolla, CA) y transformado en células competentes de OneShot™ de *E. coli* según las instrucciones de los fabricantes (Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Transformantes fueron seleccionados a 37°C después de 16 horas de crecimiento en 2X placas de agar con triptona - levadura (YT) suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. ADN plásmido de estos transformantes fue purificado usando un robot QIAGEN, (QIAGEN Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante y la

5 secuencia de ADN de los insertos confirmada por secuenciación del ADN usando cebadores M13 (-20) directos y M13 inversos (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) y los siguientes cebadores internos. El plásmido que contiene el fragmento de PCR de 1200 bp fue designado pCR2.1-sehasA (Figura 3).

Cebador 3:

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

10 Cebador 4:

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

Cebador 5:

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

Cebador 6:

15 5'-TCAGCACTTCCATCGTCAAC-3' (SEC ID nº: 8)

Cebador 7:

5'-GGATATTACCTGTAACGGAT-3' (SEC ID nº: 9)

Cebador 8:

5'-TCCATAGGGCTACAAAAGGA-3' (SEC ID nº: 10)

20

[0160] El gen de UDP-glucosa-6-deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (tuaD, número de acceso BG12691, SEC ID NOs: 11 [secuencia de ADN] y 12 [secuencia de aminoácido deducido]) fue amplificado por PCR de *Bacillus subtilis* 168 (BGSC 1A1, Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH) usando cebadores 9 y 10:

Cebador 9:

25 5'-GGTACCGACACTGCGACCATTATAAA-3' (SEC ID nº: 13)

Cebador 10:

5'-GTAAACGAATTCCAGCTATGTATCTAGACAGCTTCAACCAAGTAACACT-3' (SEC ID nº: 14)

[0161] Amplificaciones de PCR fueron realizadas por triplicado en reacciones de 30 µl compuestas por 50 ng de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* 168, 0.3 µM cada una de cebadores 9 y 10, 200 µM cada una de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 9 minutos; 5 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1.5 minutos; 32 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 54°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1.5 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto PCR fue visualizado en un gel de

35 agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El fragmento previsto fue de aproximadamente 1400 bp.

[0162] El fragmento de PCR de 1400 bp fue clonado en pCR2.1 usando el TA-TOPO Cloning Kit y transformado en células competentes OneShot™ de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. ADN plásmido fue purificado usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y la secuencia de ADN de los insertos confirmada por secuenciación del

40 ADN usando cebadores M13 (-20) directos y M13 inversos y los siguientes cebadores internos. El plásmido que contiene el fragmento de PCR de 1400 bp fue designado pCR2.1-tuaD (Figura 4).

Cebador 11:

5'-AGCATCTTAACGGCTACAAA-3' (SEC ID nº: 15)

Cebador 12:

5'-TGTGAGCGAGTCGGCGCAGA-3' (SEC ID nº: 16)

5 Cebador 13:

5'-GGGCGCCCATGTAAAAGCAT-3' (SEC ID nº: 17)

Cebador 14:

5'-TTTGTAGCCGTTAAGATGCT-3' (SEC ID nº: 18)

Cebador 15:

10 5'-TCTGCGCCGACTCGCTCACA-3' (SEC ID nº: 19)

Cebador 16:

5'-ATGCTTTTACATGGGCGCCC-3' (SEC ID nº: 20)

[0163] El gen de UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa de *Bacillus subtilis* (gtaB, número de acceso BG10402, SEC ID NOs: 21 [secuencia de ADN] y 22 [secuencia de aminoácidos deducida]) fue amplificado por PCR de *Bacillus subtilis* 168 usando los cebadores 17 y 18: Cebador 17: 5'-TCTAGATTTTTGATCATAAGGAAGGT-3' (SEC ID nº: 23)

Cebador 18:

5'-GTTAACGAATTCCAGCTATGTAGGATCCAATGTCCAATAGCCTTTTTGT-3' (SEC ID nº: 24)

20 [0164] Amplificaciones de PCR fueron realizadas por triplicado en reacciones de 30 µl compuestas por 50 ng de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* 168, 0.3 µM cada uno de los cebadores 17 y 18, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 9 minutos; 5 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1.5 minutos; 32 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 54°C durante 1 minuto, 25 y 72°C durante 1.5 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto PCR fue visualizado en un 0.8% agarosa-0.5X gel TBE. El fragmento previsto fue de aproximadamente 900 bp.

[0165] El fragmento de PCR de 900 bp fue clonado en pCR2.1 usando el TA-TOPO Cloning Kit y transformado en células competentes OneShot™ de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. ADN plásmido fue purificado usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y la secuencia de ADN de los insertos confirmada por secuenciación del ADN usando los cebadores M13 (-20) directo y M13 inverso y los siguientes cebadores internos. El plásmido que contiene el fragmento de PCR de 900 bp fue designado pCR2.1-gtaB (Figura 5).

Cebador 19:

5'-AAAAAGGCTTCTAACCTGGC-3' (SEC ID nº: 25)

35 Cebador 20:

5'-AAACCGCCTAAAGGCACAGC-3' (SEC ID nº: 26)

Cebador 21:

5'-GCCAGGTTAGAAGCCTTTTT-3' (SEC ID nº: 27)

Cebador 22:

40 5'-GCTGTGCCTTTAGGCGGTTT-3' (SEC ID nº: 28)

[0166] El gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa de *Bacillus subtilis* (*gcaD*, número de acceso BG10113, SEC ID NOs: 29 [secuencia de ADN] y 30 [secuencia de aminoácidos deducida]) fue amplificado por PCR de *Bacillus subtilis* 168 usando los cebadores 23 y 24: Cebador 23: 5'-GGATCCTTTCTATGGATAAAAGGGAT-3' (SEC ID nº: 31) cebador 24: 5'-GTTAACAGGATTATTTTTATGAATATTTTT-3' (SEC ID nº: 32)

5

[0167] Amplificaciones de PCR fueron realizadas por triplicado en reacciones de 30 µl compuestas por 50 ng de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* 168 0.3 µM cada uno de los cebadores 23 y 24, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 9 minutos; 5 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1.5 minutos; 32 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 54°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1.5 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR fue visualizado en un 0.8% de agarosa-0.5X gel TBE . El fragmento previsto fue aproximadamente de 1500 bp.

10

[0168] El fragmento de PCR de 1500 bp fue clonado en pCR2.1 usando el TA-TOPO Cloning Kit y transformado en células competentes OneShot™ de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. ADN plásmido fue purificado usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y la secuencia de ADN de los insertos confirmada por secuenciación del ADN usando cebadores M13 (-20) directo y M13 inverso y los siguientes cebadores internos. El plásmido que contiene el fragmento de PCR de 900 bp fue designado pCR2.1-*gcaD* (Figura 6).

15

Cebador 25:

5'-CAGAGACGATGGAACAGATG-3' (SEC ID nº: 33)

Cebador 26:

5'-GGAGTTAATGATAGAGTTGC-3' (SEC ID nº: 34)

Cebador 27:

5'-GAAGATCGGGAATTTGTAG-3' (SEC ID nº: 35)

20

Cebador 28:

5'-CATCTGTTCCATCGTCTCTG-3' (SEC ID nº: 36)

Cebador 29:

5'-GCAACTCTATCATTA ACTCC-3' (SEC ID nº: 37)

Cebador 30:

5'-CTACAAAATTC CCGATCTTC-3' (SEC ID nº: 38)

25

Ejemplo 2: Construcción del operón *hasA/tuaD/gtaB*

[0169] Plásmidos pDG268 neo-cryIIIAstab/Sav (patente estadounidense nº. 5,955,310) y pCR2.1-*tuaD* (ejemplo 1, Figura 4) fueron digeridos con *KpnI* y *HpaI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE y el fragmento de vector más grande (aproximadamente 7700 bp) de pDG268 neo-cryIIIAstab/Sav y el fragmento más pequeño *tuaD* (aproximadamente 1500 bp) de pCR2.1-*tuaD* fueron purificados de gel usando el DNA Extraction Kit QIAquick según las instrucciones del fabricante, (QIAGEN Valencia, CA). Los dos fragmentos purificados fueron unidos ente sí con T4 ADN-ligasa según las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science; Indianapolis, IN) y la mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli* (Stratagene, Inc., la Jolla, CA). Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml.

35

40

[0170] ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión con *Kpn* más *HpaI* en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *KpnI/HpaI* *tuaD* de aproximadamente 1500 bp y fue designado pHA1 (Figura 7).

5

[0171] Plásmidos pHA1 y pCR2.1-*gtaB* (ejemplo 1, Figura 5) fueron digeridos con *XbaI* y *HpaI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE y el fragmento de vector más grande de pHA1 (aproximadamente 9200 bp) y el fragmento *gtaB* más pequeño (aproximadamente 900 bp) de pCR2.1-*gtaB* fueron purificados de un gel de agarosa al 0.8% -0.5X tampón TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Estos dos fragmentos purificados fueron unidos entre sí con T4 ADN-ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C.

10

[0172] Plásmidos fueron purificados de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizados por digestión de *XbaI* más *HpaI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0.8% -0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *XbaI/HpaI* *gtaB* de aproximadamente 900 bp y fue designado pHA2 (Figura 8).

15

[0173] Plásmidos pHA2 y pCR2.1-*sehasA* (Ejemplo 1, Figura 3) fueron digeridos con *SacI* más *KpnI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0.8% -0.5X tampón TBE. El fragmento de vector más grande (aproximadamente 10000 bp) de pHA2 y el fragmento de *hasA* más pequeño (aproximadamente 1300 bp) de pCR2.1-*sehasA* fueron purificadas en gel de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X tampón TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados fueron unidos entre sí con T4 DNA-ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C. Los plásmidos fueron purificados de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizados por digestión de *SacI* más *KpnI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *hasA* de *SacI/KpnI* aproximadamente 1300 bp y fue designado pHA3 (Figura 9).

20

25

30 **Ejemplo 3: Construcción del operón *hasA/tuaD/gtaB/gcaD***

[0174] Plásmidos pHA2 (ejemplo 2, Figura 8) y pCR2.1-*gcaD* (Ejemplo 1, Figura 6) fueron digeridos con *BamHI* y *HpaI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0,8% usando tampón 0,5X TBE y el fragmento de vector más grande (aproximadamente 10,000 bp) de pHA2 y el fragmento de *gcaD* más pequeño (aproximadamente 1,400 bp) de pCR2,1-*gcaD* fueron purificados de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X tampón TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Estos dos fragmentos purificados fueron unidos entre sí con T4 DNA-ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C.

35

[0175] Plásmidos fueron purificados de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizados por digestión *XbaI* más *HpaI*. Las digestiones fueron resueltas en un gel de agarosa al 0.8% -0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *gcaD* *BamHI/HpaI* de aproximadamente

40

1400 bp y fue designado pHA4 (Figura 10).

[0176] Plásmidos pHA4 y pCR2.1-sehasA (ejemplo 1, Figura 3) fueron digeridos con *SacI* y *KpnI*. Las digestiones fueron redisueltas en un gel de agarosa al 0,8% -0,5X tampón TBE. El fragmento de vector más grande (aproximadamente 11, 000 bp) de pHA4 y el fragmento de *hasA* más pequeño (aproximadamente 1,300 bp) de pCR2,1-sehasA fueron purificados en gel de un gel de agarosa al 0,8% -0,5X tampón TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados fueron ligados juntos con T4 DNA-ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C. Los plásmidos fueron purificados de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizados por digestión *SacI* más *KpnI*. Las digestiones fueron redisueltas en un gel de agarosa al 0,8% -0,5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento de *hasA* *SacI/KpnI* de aproximadamente 1, 300 bp y fue designado pHA5 (Figura 11).

Ejemplo 4: Construcción del operón *hasA/tuaD/gcaD*

[0177] Plásmidos pHA1 (Ejemplo 2, Figura 7) y pCR2.1-gcaD (Ejemplo 1, Figura 6) fueron digeridos con *BamHI* y *HpaI*. Las digestiones fueron redisueltas en un gel de agarosa al 0,8% usando 0,5X tampón TBE y el fragmento de vector más grande de pHA1 (aproximadamente 9,200 bp) y el fragmento de *gcaD* más pequeño (aproximadamente 1400 bp) de pCR2.1-gcaD fueron purificados en gel de un gel de agarosa al 0,8% -0,5X tampón TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Estos dos fragmentos purificados fueron unidos entre sí con T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C.

[0178] Los plásmidos fueron purificados de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizados por digestión *BamHI* más *HpaI*. Las digestiones fueron redisueltas en un gel de agarosa al 0,8%-0,5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *gtaB* de *BamHI/HpaI* de aproximadamente 1400 bp y fue designado pHA6 (Figura 12).

[0179] Plásmidos pHA6 y pCR2.1-sehasA (Ejemplo 1, Figura 3) fueron digeridos con *SacI* más *KpnI*. Las digestiones fueron redisueltas en un gel de agarosa al 0,8%-0,5X tampón TBE. El fragmento de vector más grande (aproximadamente 10,200 bp) de pHA6 y el fragmento *hasA* más pequeño (aproximadamente 1,300 bp) de pCR2,1-sehasA fueron purificados de gel de un gel de agarosa de 0,8% -0,5X tampón TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados fueron unidos entre sí con T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. Los plásmidos fueron purificados de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizados por digestión con *SacI* más *KpnI*. Las digestiones fueron redisueltas en un gel de agarosa al 0,8%-0,5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *hasA* de *SacI/KpnI* de aproximadamente 1300 bp y fue designado pHA7 (Figura 13).

Ejemplo 5: Construcción de *Bacillus subtilis* RB161

[0180] Plásmido pDG268MCSΔneo/scBAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido con *SacI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente

digerido con NotI. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 6800 bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X de TBE según las instrucciones del fabricante, (QIAGEN Valencia, CA). El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el inserto de ADN descrito abajo.

5 [0181] El plásmido pHA3 (Ejemplo 2, Figura 9) fue digerido con SacI. El plásmido digerido fue luego purificado como se ha descrito anteriormente, y finalmente digerido con NotI. El fragmento de plásmido menor de aproximadamente 3800 bp fue purificado en gel como se ha descrito anteriormente. El vector recuperado y el inserto de ADN fueron ligados usando el "Rapid DNA Cloning Kit" (Roche Applied Science; Indianapolis, IN) según las instrucciones del fabricante. Antes de la transformación en *Bacillus subtilis*, la ligación anteriormente descrita fue linealizada usando *ScaI* para asegurar la
10 integración de doble reticulación en el cromosoma mejor que la integración de reticulación única en el cromosoma. Células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4 fueron transformadas con los productos de ligación digeridos con *ScaI*. *Bacillus subtilis* 168Δ4 se deriva de la cepa de tipo *Bacillus subtilis* 168 (BGSC 1A1, Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH) y tiene deleciones en los genes *spollAC*, *aprE*, *nprE*, y *amyE*. La deleción de estos cuatro genes fue realizada esencialmente como se describe para *Bacillus subtilis* A164Δ5, que está descrita en detalle en la patente estadounidense n°. 5,891,701.

15 [0182] Transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados a 34°C después 16 horas de crecimiento en placas con base de agar-sangre de triptosa (TBAB) suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml. Para visualizar la integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE*, transformantes primarios de *Bacillus subtilis* fueron parcheados en placas TBAB suplementadas con 6 µg de neomicina por ml y en placas TBAB suplementadas con 5
20 µg de cloranfenicol por ml. La integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE* no incorpora el gen de resistencia a la neomicina y por lo tanto vuelve a la cepa sensible a la neomicina. Aislados fueron también parcheados sobre placas mínimas para visualizar si éstas estaban produciendo o no ácido hialurónico. Los aislados que producían ácido hialurónico tienen un fenotipo "mojado" en placas mínimas. Usando esta visualización de placa, los transformantes "mojados" sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol (debido a la producción de ácido hialurónico) fueron
25 aislados a 37°C.

[0183] ADN genómico fue aislado los transformantes "mojados" de *Bacillus subtilis* 168Δ4 sensibles a la neomicina, resistentes al cloranfenicol usando una columna QIAGEN tip-20, (QIAGEN Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Amplificaciones de PCR fueron realizadas en estos transformantes usando los oligonucleótidos sintéticos más
30 abajo, que se basan en las secuencias de genes *hasA*, *tuaD*, y *gtaB*, para confirmar la presencia e integridad de estos genes en el operón de los transformantes de *Bacillus subtilis*.

[0184] Las reacciones de amplificación (25 µl) fueron compuestas de aproximadamente 50 ng de ADN genómico de los transformantes de *Bacillus subtilis* 168Δ4, 0.5 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X
35 tampón PCR II, 3 mM de MgCl₂, y 0.625 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador RoboCycler 40 programado para un ciclo a 95°C durante 9 minutos; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos; y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos.

[0185] Cebadores 3 y 8 fueron usados para confirmar la presencia del gen *hasA*, cebadores 3 y 16 para confirmar la presencia del gen *tuaD*, y cebadores 3 y 22 para confirmar la presencia del gen *gtaB*. El integrante *hasA/tuaD/gtaB* de
40 *Bacillus subtilis* 168Δ4 fue designado *Bacillus subtilis* RB158.

[0186] ADN genómico fue aislado de *Bacillus subtilis* RB158 usando una columna QIAGEN tipo 20 según las instrucciones del fabricante, y fue usado para transformar *Bacillus subtilis* A164Δ5 competentes (eliminado en los genes *spolIAC*, *aprE*, *nprE*, *amyE*, y *srfC*; véase patente estadounidense n°. 5,891,701). Transformantes fueron seleccionados en placas de TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. Un integrante *hasA/tuaD/gtaB* de *Bacillus subtilis* A164Δ5 fue identificado por su fenotipo "mojado" y designado *Bacillus subtilis* RB161.

Ejemplo 6: Construcción de *Bacillus subtilis* RB163

[0187] Plásmido pDG268MCSΔneo/scBAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido con *SacI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 6,800 bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X TBE de según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el inserto de ADN descrito abajo.

[0188] El plásmido pHA7 (Ejemplo 4, Figura 13) fue digerido con *SacI*. El plásmido digerido fue luego purificado como se ha descrito anteriormente, y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento de plásmido más pequeño de aproximadamente 4,300 bp fue purificado en gel como se ha descrito anteriormente. El vector recuperado y el inserto de ADN fueron ligados usando el "Rapid DNA Cloning Kit" según las instrucciones del fabricante. Antes de la transformación en *Bacillus subtilis*, la ligación anteriormente descrita fue linealizada usando *Scal* para asegurar la integración de doble reticulación en el cromosoma mejor que la integración de reticulación única en el cromosoma. Células competentes de *Bacillus subtilis* 168A4 fueron transformadas con la ligación digerida con la enzima de restricción *Scal*.

[0189] Transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados en placas TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. Para visualizar la integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE*, los transformantes primarios de *Bacillus subtilis* fueron parcheados en placas TBAB suplementadas con 6 µg de neomicina por ml y en placas TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml para aislar transformantes "mojados" resistentes al cloranfenicol y sensibles a la neomicina (debido a la producción de ácido hialurónico).

[0190] ADN genómico fue aislado de los transformantes "mojados", resistentes al cloranfenicol, y sensibles a la neomicina de *Bacillus subtilis* 168Δ4 usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Amplificaciones de PCR fueron realizadas en estos transformantes usando cebadores 3, 8, 16, 22 y cebador 30 (ejemplo 1) para confirmar la presencia e integridad de estos genes en el operón de los transformantes de *Bacillus subtilis*. Las reacciones de amplificación (25 µl) fueron compuestas de aproximadamente 50 ng de ADN genómico de los transformantes de *Bacillus subtilis* 168Δ4, 0.5 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR, 3 mM MgCl₂, y 0.625 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador RoboCycler 40 programado para un ciclo a 95°C durante 9 minutos; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos; y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos.

[0191] Cebadores 3 y 8 fueron usados para confirmar la presencia del gen *hasA*, cebadores 3 y 16 para confirmar la presencia del gen *tuaD*, cebadores 3 y 22 para confirmar la presencia del gen *gtaB*, y cebadores 3 y 30 para confirmar la presencia del gen *gcaD*. El integrante *hasA/tuaD/gcaD* de *Bacillus subtilis* 168Δ4 fue designado *Bacillus subtilis* RB160.

[0192] ADN genómico fue aislado de *Bacillus subtilis* RB160 usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante, y fue usado para transformar *Bacillus subtilis* A164Δ5 competentes. Transformantes fueron seleccionados en placas TBAB conteniendo 5 µg de cloranfenicol por ml, y crecidos a 37°C durante 16 horas. El integrante *hasA/tuaD/gcaD* de *Bacillus subtilis* A164Δ5 fue identificado por su fenotipo "mojado" y designado *Bacillus subtilis* RB163.

Ejemplo 7: Construcción de *Bacillus subtilis* TH-1

[0193] El operón de hialuronano sintasa (*has*) se obtuvo de *Streptococcus equisimilis* usando el siguiente procedimiento. El operón *has* está compuesto de los genes *hasA*, *hasB*, *hasC*, y *hasD*. Aproximadamente 20 µg de *Streptococcus equisimilis* D181 (Kumari y Weigel, 1997, Journal of Biological Chemistry 272: 32539-32546) ADN cromosómico fue digerido con HindIII y redisolto en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE. ADN en el intervalo de 3-6 kb fue cortado del gel y purificado usando el "QIAquick DNA Gel Extraction Kit" según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado fue luego unido con el vector de ADN descrito abajo.

[0194] El plásmido pUC18 (2 µg) fue digerido con HindIII y las extremidades salientes 5' fueron desfosforiladas con fosfatasa alcalina de gamba según las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science; Indianapolis, IN). El vector desfosforilado e inserto de ADN fueron ligados usando el "Rapid DNA Cloning Kit" según las instrucciones del fabricante. La unión fue usada para transformar células competentes Gold Kan de *E. coli* XL1 0 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Células fueron colocadas en placas de caldo Luria (100 µg/ml ampicilina) e incubadas durante toda la noche a 37°C. Cinco placas conteniendo aproximadamente 500 colonias/placa fueron evaluadas con oligo 952-55-1, mostrado más abajo, que es una secuencia de 54 bp idéntica a la cadena transcrita cerca del extremo 3' del gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* D181 (nucleótidos 1098-1151 con respecto a un residuo del codón de inicio de la traducción ATG).

Cebador 31:

5'-GTGTCGGAACATTCATTACATGCTTAAGCACCCGCTGTCCTTCTTGTTATCTCC-3' (SEC ID nº: 39)

[0195] La sonda de oligonucleótidos fue marcada con DIG usando el kit de marcado del extremo 3' del oligonucleótido DIG según las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science; Indianapolis, IN). La hibridación de colonias y detección quimioluminiscente fueron realizadas como se describe en "THE DIG SYSTEM USER'S GUIDE FOR FILTER HYBRIDIZATION", Boehringer Mannheim GmbH.

[0196] Siete colonias fueron identificadas que se hibridaron a la sonda. ADN plásmido de uno de estos transformantes fue purificado usando un robot QIAGEN, (QIAGEN Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante, digerido con HindIII, y redisolto en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón de TBE. El inserto de ADN fue mostrado para ser aproximadamente 5 kb en tamaño. Este plásmido fue designado pMRT106 (Figura 14).

[0197] La secuencia de ADN del fragmento clonado fue determinada usando el EZ::TN™ <TET-1> Insertion Kit según las instrucciones del fabricante (Epicenter Technologies, Madison, WI). La secuenciación reveló que el inserto de ADN clonado contenía los últimos 1156 bp del gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* seguido de otros tres genes designados *hasB*, *hasC*, y *hasD*; supuestamente los cuatro genes están contenidos dentro de un único operón y son por lo tanto cotranscritos. El gen *hasB* de *Streptococcus equisimilis* está contenido en los nucleótidos 1411-2613 (SEC ID NOs: 40 [secuencia de ADN] Y 41 [secuencia de aminoácidos deducida]) del fragmento, y gen *hasC* de *Streptococcus equisimilis* en nucleótidos

2666-3565 (SEC ID Nos: 42 [secuencia de ADN] y 43 [secuencia de aminoácidos deducida]) del fragmento, y gen *hasD* de *Streptococcus equisimilis* en los nucleótidos 3735-5114 (SEC ID NOs: 44 [secuencia de ADN] y 45 [secuencia de aminoácidos deducida]) del fragmento.

5 [0198] Los polipéptidos codificados por los genes *hasB* y *hasC* de *Streptococcus equisimilis* muestran cierta homología a aquellos codificados por los genes *hasB* y *hasC*, respectivamente, de la secuencia del operón *has* de *Streptococcus pyogenes* (Ferretti et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U.. 98 (8), 4658-4663). El grado de identidad fue determinado por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software Vector NTI AlignX (Informax Inc., Bethesda, MD) con los siguientes valores predeterminados: alineación de parejas, penalización de abertura de espacio de 10,
10 penalización de extensión de espacio de 0.1, y matriz de puntuación: blosum62mt2.

[0199] Comparaciones de secuencias de aminoácidos mostraron que la proteína HasB de *Streptococcus equisimilis* tiene una identidad del 70% a la proteína HasB de *Streptococcus uberis* (SEC ID n°: 105); la proteína HasC de *Streptococcus equisimilis* tiene una identidad del 91% a la proteína HasC de *Streptococcus pyogenes* (SEC ID n°: 99); y la proteína HasD de *Streptococcus equisimilis* tiene una identidad del 73% a la proteína GImU (una UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa putativa) de *Streptococcus pyogenes* (acceso # Q8P286). El gen HasD de *Streptococcus equisimilis* codifica un polipéptido que muestra un 50.7% de identidad a la enzima de UDP-N-acetil-glucosamina pirofosforilasa codificada por el gen *gcaD* de *Bacillus subtilis*.

20 [0200] El plásmido pHA5 (ejemplo 3, Figura 11) fue digerido con HpaI y BamHI. La digestión fue rediseñada en un gel de agarosa al 0,8% usando 0,5X tampón TBE y el fragmento de vector más grande (aproximadamente 11,000 bp) fue purificado del gel usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. El plásmido pMRT106 fue digerido con HindIII, las extremidades pegajosas fueron rellenadas con fragmento Klenow, y el ADN fue digerido con BamHI. La digestión fue rediseñada en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE y el fragmento de inserto más pequeño
25 (aproximadamente 1000 bp, los últimos 2/3 del gen *hasD* de *Streptococcus equisimilis*) fue purificado del gel usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

[0201] Los dos fragmentos purificados fueron unidos entre sí con T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli*. Los transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C.
30

[0202] ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión con *BamHI* más *NotI* en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón de TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento de *hasD BamHI/NotI* de aproximadamente 1.100 bp y
35 fue designado pHA8 (Figura 15). Este plásmido fue digerido con *HindIII* y ligado con T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión con *HindIII* en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de una única banda de aproximadamente 9,700 bp
40 y fue designado pHA9 (Figura 16).

- [0203] El plásmido pHA9 fue digerido con *SacI* y *NotI*. La digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 0,8% usando 0,5X tampón TBE y el fragmento más pequeño de aproximadamente 2.500 bp fue purificado en gel usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. El plásmido pDG268MCSΔneo/scBAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido con *SacI* y *NotI*. La digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 0,8% usando 0,5X tampón TBE y el fragmento de vector mayor de aproximadamente 6,800 bp fue purificado del gel usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados fueron ligados con T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli* (Stratagene, Inc., la Jolla, CA). Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml.
- 5 [0204] ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión *Sall* más *HindIII* en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento *Sall/HindIII* de aproximadamente 1600 bp y fue designado pHA10 (Figura 17).
- 15 [0205] EL Plásmido pHA10 fue digerido con *HindIII* y *BamHI*. La digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE y el fragmento de vector MAYOR (aproximadamente 8100 bp) fue purificado del gel usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. El plásmido pMRT106 fue digerido con *HindIII* y *BamHI*. La digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 0,8% usando 0,5X tampón TBE y el fragmento de inserto mayor de aproximadamente 4,100 bp fue purificado en gel usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados fueron unidos con T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación fue usada para transformar *Bacillus subtilis* 168Δ4. Transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. Aproximadamente 100 transformantes fueron parcheados sobre TBAB suplementado con cloranfenicol (5 µg/ml) y TBAB suplementado con neomicina (10 µg/ml) para puntuar las colonias resistentes al cloranfenicol sensibles a la neomicina; este fenotipo es indicativo de una doble reticulación en el locus *amyE*. Unas pocas de tales colonias fueron identificadas, todas ellas expusieron un fenotipo "mojado" indicando que ácido hialurónico estaba siendo producido. Una colonia fue elegida y designada *Bacillus subtilis* 16BΔ4::scBAN/se hasA/hasB/hasC/hasD.
- 20 [0206] ADN genómico fue aislado de *Bacillus subtilis* 168Δ4:acBAN/se hasA/hasB/hasC/hasD usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante, y usado para transformar *Bacillus subtilis* A164Δ5 competentes. Transformantes fueron seleccionados en placas de TBAB conteniendo 5 µg de cloranfenicol por ml, y crecidos a 37°C durante 16 horas. El integrante hasA/hasB/hasC/hasD de *Bacillus subtilis* A164Δ5 fue identificado por su fenotipo "mojado" y designado *Bacillus subtilis* TH-1.
- 25

Ejemplo 8: Construcción de *Bacillus subtilis* RB184

- 35 [0207] El gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* (ejemplo 1) y el gen *tuaD* (un homólogo de *hasB* de *Bacillus subtilis*) (Ejemplo 1) fueron clonados para estar bajo el control de un promotor corto de "consenso" de *amyQ* (scBAN) (patente estadounidense n°. 5,955,310).
- [0208] Plásmido pDG268MCSΔneo/scBAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido con *SacI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento del plásmido mayor de aproximadamente 6,800 bp fue purificado de gel a partir de un gel de
- 40

agarosa al 0,8% -0,5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego unido con el inserto de ADN descrito abajo.

5 [0209] El plásmido pHA5 (ejemplo 3, Figura 11) fue digerido con *HpaI*. El plásmido digerido fue luego purificado como se ha descrito anteriormente, y finalmente digerido con *XbaI*. El plásmido digerido doble fue luego embotado por inactivación primero de *XbaI* a 85°C durante 30 minutos. Embotamiento fue realizado añadiendo 0.5 µl de 10 mM cada dNTPs, 1 µl de 1 U/µl T4 ADN polimerasa (Roche Applied Science; Indianapolis, IN) e incubando a 11°C durante 10 minutos. Finalmente la polimerasa fue inactivada incubando la reacción a 75°C durante 10 minutos. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 11,000 bp fue luego purificado del gel como se ha descrito anteriormente y religado usando el "Rapid DNA Cloning Kit" según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C. ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión con *ScaI* en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento de aproximadamente 11 kb y fue designado pRB157 (Figura 18).

15 [0210] pRB157 fue digerido con *SacI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento de plásmido menor de aproximadamente 2,632 bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit a partir de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X gel TBE según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado fue luego ligado con el ADN del vector anteriormente descrito.

20 [0211] Antes de la transformación en *Bacillus subtilis*, la ligación anteriormente descrita fue linealizada usando *ScaI* para asegurar integración de doble reticulación en el cromosoma mejor que la integración de reticulación única en el cromosoma. Células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4 fueron transformadas con la ligación digerida con la enzima de restricción *ScaI*.

25 [0212] Transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados en placas TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml. Para visualizar la integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE*, transformantes primarios de *Bacillus subtilis* fueron parcheados en placas TBAB suplementadas con 6 µg de neomicina por ml y en placas TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml para aislar transformantes sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol "mojado" (debido a la producción de ácido hialurónico).

30 [0213] ADN genómico fue aislado de los transformantes "mojados", resistentes al cloranfenicol, y sensibles a la neomicina de *Bacillus subtilis* 168Δ4 usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Amplificaciones de PCR fueron realizadas en estos transformantes usando cebadores 3, 8, y 16 (Ejemplo 1) para confirmar la presencia e integridad de *hasA* y *tuaD* en el operón de los transformantes de *Bacillus subtilis*. Las reacciones de amplificación (25 µl) fueron compuestas de aproximadamente 50 ng de ADN genómico de los transformantes de *Bacillus subtilis* 168Δ4, 0.5 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR, 3 mM MgCl₂, y 0.625 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador RoboCycler 40 programado para un ciclo a 95°C durante 9 minutos; 30 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos; y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos.

[0214] Cebadores 3 y 8 fueron usados para confirmar la presencia del gen *hasA* y cebadores 3 y 16 para confirmar la presencia del gen *tuaD*. Un integrante *hasA/tuaD* de *Bacillus subtilis* 168Δ4 fue designado *Bacillus subtilis* RB183.

5 [0215] ADN genómico de *Bacillus subtilis* RB183 fue también usado para transformar *Bacillus subtilis* A164Δ5 competentes. Transformantes fueron seleccionados en placas TBAB conteniendo 5 µg de cloranfenicol por ml, y crecidos a 37°C durante 16 horas. El integrante *hasA/tuaD* de *Bacillus subtilis* A164Δ5 fue identificado por su fenotipo "mojado" y designado *Bacillus subtilis* RB184.

10 **Ejemplo 9: Construcción de *Bacillus subtilis* RB187**

[0216] *Bacillus subtilis* RB161 fue hecho competente y transformado con el plásmido pRB115 de delección *cat* (Widnen et al., 2000, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 25: 204-212). La selección para la integración directa en el cromosoma fue realizada a la temperatura no permisiva de 45°C usando la selección de eritromicina (5 µg/ml). A esta temperatura, el origen pE194 de replicación está inactivo. Las células son capaces de mantener resistencia a la eritromicina sólo por integración del plásmido en el gen *cat* en el cromosoma bacteriano. Los denominados "integrantes" fueron mantenidos a 45°C para asegurar el crecimiento a esta temperatura con selección. Para permitir la pérdida o "deformación del bucle" del plásmido, que resultará en la delección de la mayor parte del gen *cat* del cromosoma, los integrantes fueron crecidos en un medio Luria-Bertani (LB) sin selección a la temperatura permisiva de 34°C para muchas generaciones. A esta temperatura el origen pE194 de replicación está activo y promueve la escisión del plásmido del genoma (Molecular Biological Methods for Bacillus, edited by C.R. Harwood and S.M. Cutting, 1990, John Wiley and Sons Ltd.).

[0217] Las células fueron luego colocadas en placas de LB agar no selectivas y colonias que contenían delecciones en el gen *cat* y pérdida del replicon basado en pE194 fueron identificadas por el siguiente criterio: (1) sensibilidad al cloranfenicol indicó la presencia de la delección de *cat*; (2) sensibilidad de eritromicina indicó la ausencia del gen de resistencia a la eritromicina codificado por el vector pRB115 y (3) PCR confirmó la presencia de la delección de *cat* en la cepa de interés. PCR fue realizada para confirmar la delección del gen *cat* en el locus *amyE* usando cebadores 32 y 33:

Cebador 32: 5'-GCGGCCGCGGTACCTGTGTTACACCTGTT-3' (SEC ID n°: 46)

Cebador 33: 5'-GTCAAGCTTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGG-3' (SEC ID n°: 47)

30 [0218] ADN cromosómico de deleccionantes potenciales fue aislado usando los REDextract-N-Amp™ Plant PCR kits (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) de la siguiente manera: colonias de *Bacillus* únicas fueron inoculadas en 100 µl de solución de extracción (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), incubadas a 95°C durante 10 minutos, y luego diluidas con un volumen igual de solución de dilución (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). PCR fue realizada usando 4 µl de ADN extraído conjuntamente con la REDextract-N-Amp PCR Reaction Mix y los cebadores deseados según las instrucciones del fabricante, con las condiciones del ciclo de PCR descritas en el Ejemplo 5. Los productos de reacción de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE. La cepa verificada fue denominada *Bacillus subtilis* RB187.

40 **Ejemplo 10: Construcción de *Bacillus subtilis* RB192**

[0219] *Bacillus subtilis* RB184 fue desmarcada por delección del gen de resistencia al cloranfenicol (gen *cat*). Esto fue realizado usando el método descrito previamente en el Ejemplo 9. La cepa resultante fue designada *Bacillus subtilis* RB192.

Ejemplo 11: Construcción de *Bacillus subtilis* RB194

[0220] *Bacillus subtilis* RB194 fue construida por delección de la región *cypX* del cromosoma de *Bacillus subtilis* RB187 (ejemplo 9). La región *cypX* incluye el gen *cypX* que codifica una enzima tipo citocromo P450 implicada en la síntesis de un pigmento rojo durante la fermentación. Para eliminar esta región del plásmido de cromosoma, pMRT086 fue construido.

[0221] La región del cromosoma que alberga los operones *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA* fue amplificada por PCR de *Bacillus subtilis* BRG-1 como un único fragmento usando los cebadores 34 y 35. *Bacillus subtilis* BRG1 es esencialmente un aislado químicamente mutagenizado de una cepa de producción de amilasa de *Bacillus subtilis* que se basa en el contexto genético de *Bacillus subtilis* A164Δ5 que fue descrito en el Ejemplo 5. La secuencia de esta región es idéntica a la secuencia publicada para la cepa de tipo de *Bacillus subtilis* 168.

Cebador 34: 5'-CATGGGAGAGACCTTTGG-3' (SEC ID n°: 48)

Cebador 35: 5'-GTCGGTCTCCATTTGC-3' (SEC ID n°: 49)

[0222] Las reacciones de amplificación (50 µl) fueron compuestas de 200 ng de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* BRG-1, 0.4 µM cada uno de los cebadores 34 y 35, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X tampón de alta fidelidad Expand™ (Roche Applied Science; Indianapolis IN) con 1.5 mM MgCl₂, y 2.6 unidades de mezcla enzimática del sistema PCR de alta fidelidad Expand™ (Roche Applied Science; Indianapolis, IN). ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* BRG-1 se obtuvo usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 (Stratagene, Inc, la Jolla, CA) programado durante 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos; 10 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto, y 68°C durante 4 minutos; 20 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto, 68°C durante 4 minutos más 20 segundos por ciclo, seguidos de 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. Productos reactivos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa usando un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE.

[0223] El fragmento resultante que comprende los operones *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA* fue clonado en pCR2.1 usando el equipo de clonación TA-TOPO y transformado en células OneShot™ de *E. coli* según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado por secuenciación del ADN con M13 (-20) directo, M13 inverso y cebadores 36 a 51 mostrados más abajo. El plásmido resultante fue designado pMRT084 (Figura 19).

Cebador 36: 5'-CGACCACTGTATCTTGG-3' (SEC ID n°: 50)

Cebador 37: 5'-GAGATGCCAAACAGTGG3' (SEC ID n°: 51)

Cebador 38: 5'-CATGTCCATCGTGACG-3' (SEC ID n°: 52)

Cebador 39: 5'-CAGGAGCATTTGATACG-3' (SEC ID n°: 53)

Cebador 40: 5'-CCTTCAGATGTGATCC-3' (SEC ID n°: 54)

Cebador 41: 5'-GTGTTGACGTCAACTGC-3' (SEC ID n°: 55)

Cebador 42: 5'-GTTGAGCCTTCTCTCG-3' (SEC ID n°: 56)

Cebador 43: 5'-GCTACCTTTCTTAGG-3' (SEC ID n°: 57)

Cebador 44: 5'-CGTCAATATGATCTGTGC-3' (SEC ID n°: 58)

Cebador 45: 5'-GGAAAGAAGGTCTGTGC-3' (SEC ID n°: 59)

Cebador 46: 5'-CAGCTATCAGCTGACAG-3' (SEC ID n°: 60)

Cebador 47: 5'-GCTCAGCTATGACATATTCC-3' (SEC ID n°: 61)

Cebador 48: 5'-GATCGTCTTGATTACCG-3' (SEC ID n°: 62)

Cebador 49: 5'-AGCTTTATCGGTGACG-3' (SEC ID n°: 63)

5 Cebador 50: 5'-TGAGCACGATTGCAGG-3' (SEC ID n°: 64)

Cebador 51: 5'-CATTGCGGAGACATTGC-3' (SEC ID n°: 65)

[0224] El plásmido pMRT084 fue digerido con *BsgI* para eliminar la mayor parte de los operones *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA*, dejando aproximadamente 500 bases en cada extremo. El ADN digerido con *BsgI* fue tratado con T4 ADN polimerasa. El plásmido pECC1 (Youngman et al., 1984, Plasmid 12: 1-9) fue digerido con *SmaI*. Un fragmento de aproximadamente 5.100 bp de pMRT084 y un fragmento de aproximadamente 1.600 bp de pECC1 fueron aislados de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X gel TBE usando el QIAquick DNA Extraction Kit según las instrucciones del fabricante, unidos entre sí, y transformados en células XL1 Blue de *E. coli* según las instrucciones del fabricante (Stratagene, Inc., la Jolla, CA). Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. Transformantes que llevan el plásmido correcto con la mayor parte de los operones *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA* eliminados fueron identificados por amplificación por PCR usando los cebadores 52 y 53. La amplificación por PCR fue conducida en reacciones de 50 µl compuestas por 1 ng de ADN plásmido, 0,4 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2,5 mM MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos; 25 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto de la PCR fue visualizado usando un gel de agarosa al 0,8%-0,5X TBE. Este constructo fue designado pMRT086 (Figura 20).

Cebador 52: 5'-TAGACAATTGGAAGAGAAAAGAGATA-3' (SEC ID n°: 66)

Cebador 53: 5'-CCGTCGCTATTGTAACCAAGT-3' (SEC ID n°: 67)

25 [0225] El plásmido pMRT086 fue linealizado con *ScaI* y transformado en células competentes de *Bacillus subtilis* RB128 en presencia de 0,2 µg de cloranfenicol por ml. Los transformantes fueron seleccionados en placas TBAB conteniendo 5 µg de cloranfenicol por ml tras la incubación a 37°C durante 16 horas. ADN cromosómico fue obtenido a partir de diferentes transformantes usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Colonias resistentes al cloranfenicol fueron seleccionadas por PCR para delección de los operones *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA* via PCR usando los cebadores 36 y 52, 36 y 53, 37 y 52, y 37 y 53. La amplificación de PCR fue conducida en reacciones de 50 µl compuestas por 50 ng de ADN cromosómico, 0,4 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2,5 mM MgCl₂, y 2,5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. Los productos de la PCR fueron visualizados usando un gel de agarosa al 0,8%-0,5X gel TBE. La cepa eliminada *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA* de *Bacillus subtilis* RB128 resultante fue designada *Bacillus subtilis* MaTa17.

[0226] Células competentes de *Bacillus subtilis* RB187 (Ejemplo 9) fueron transformadas con ADN genómico de *Bacillus subtilis* MaTa17. ADN genómico se obtuvo de esta cepa usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados en placas TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. Transformantes primarios fueron estridados para aislamientos de

colonias individuales en placas TBAB conteniendo 5 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. La cepa *cypX-yvmC* y *yvmB-yvmA* resultante eliminada fue designada *Bacillus subtilis* RB194.

Ejemplo 12: Construcción de *Bacillus subtilis* RB197

5 [0227] *Bacillus subtilis* RB197 es muy similar a *Bacillus subtilis* RB194, la única diferencia siendo que RB197 contiene una delección más pequeña en la región *cypX*: sólo una parte del gen *cypX* se elimina en esta cepa para generar un fenotipo de *cypX* menos. Para realizar esta tarea un plásmido, pMRT122, fue construido como se describe abajo.

10 [0228] Plásmido pCJ791 (Figura 21) fue construido por digestión de plásmido pSJ2739 (WO 96/23073) con *EcoRI/HindIII* y ligación a un fragmento con una forma eliminada del gen *wprA* (serina proteasa de pared celular) de *Bacillus subtilis*. La región 5' de *wprA* fue amplificada usando cebadores 54 y 55 véase más abajo, y la región 3' fue amplificada usando los cebadores 56 y 57 mostrados abajo de ADN cromosómico obtenido de *Bacillus subtilis* DN1885 (Diderichsen et al., 1990, Journal of Bacteriology 172: 4315-4321). Amplificación por PCR fue conducida en reacciones de 50 µl compuestas por 1 ng de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* DN1885, 0.4 µM cada uno de los cebadores 39 y 40, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

20 [0229] Los fragmentos 5' y 3' de la PCR de *wprA* fueron enlazados por digestión con BglII seguido de ligación, y la amplificación por PCR fue realizada en los fragmentos de mezcla de ligación usando los cebadores 54 y 57. La amplificación por PCR fue conducida en reacciones de 50 µl compuestas por 1 ng del fragmento ligado, 0.4 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos; 25 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto de la PCR fue visualizado usando un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE. El fragmento de PCR resultante fue clonado en pSJ2739 como un fragmento *EcoRI/HindIII*, dando como resultado el plásmido pCJ791 (Figura 21). Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de canamicina por ml tras la incubación a 28°C durante 24-48 horas. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado por amplificación por PCR con cebadores 54 y 57 usando las condiciones anteriores.

Cebador 54: 5'-GGAATTCCAAGCTGCAGCGGCCGCGCGC-3' (SEC ID n°: 68)

Cebador 55: 5'-GAAGATCTCGTATACTTGGCTTCTGCAGCTGC-3' (SEC ID n°: 69)

Cebador 56: 5'-GAAGATCTGGTCAACAAGCTGGAAAGCACTC-3' (SEC ID n°: 70)

35 Cebador 57: 5'-CCCAAGTTCGTGACGTACAGCACCGTCCGGC-3' (SEC ID n°: 71)

[0230] La secuencia en dirección ascendente de *amyL* y la región codificante 5' de plásmido pDN1981 (patente estadounidense n°. 5,698,415) fueron fusionados entre sí por SOE usando los pares del cebador 58/59 y 60/61 mostradas más abajo. El fragmento resultante fue clonado en el vector pCR2.1 para generar el plásmido pMRT032 de la siguiente manera. Amplificaciones por PCR fueron realizadas por triplicado en reacciones de 50 µl compuestas por 1 ng de pDN1981 ADN, 0.4 µM cada uno de cebadores apropiados, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con

2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 9 minutos; 3 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 52°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; 27 ciclos cada a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. El producto de la PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE.

5 Los fragmentos previstos fueron aproximadamente 530 y 466 bp, respectivamente. El fragmento de SOE final fue generado usando el par de cebadores 59/60 y clonado en un vector de pCR2.1 usando el equipo de clonación TA-TOPO. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg/ml ampicilina tras la incubación a 37°C durante 16 horas. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado por secuenciación del ADN con cebadores M13 (-20) directo y M13 inverso. El
10 plásmido que contiene la secuencia ascendente *amyL*/fragmento de fusión de la secuencia codificante 5' fue designado pMRT032 (Figura 22).

Cebador 58:

5'-CCTTAAGGGCCGAATATTTATACGGAGCTCCCTGAAACAACAAAAACGGC-3' (SEC ID n°: 72)

Cebador 59: 5'-GGTGTCTCTAGAGCGGCCGCGTTGCGGTCAGC-3' (SEC ID n°: 73)

15 Cebadores 60: 5'-GTCCTTCTTGGTACCTGGAAGCAGAGC-3' (SEC ID n°: 74)

Cebador 61: 5'-GTATAAATATTCGGCCCTTAAGGCCAGTACCATTTTCCC-3' (SEC ID n°: 75)

[0231] El plásmido pNNB194 (pSK⁺/pE194; patente estadounidense n°. 5,958,728) fue digerido con *Nsil* y *NotI*, y plásmido pBEST501 (Itaya et al. 1989 *Nucleic Acids Research* 17: 4410) fue digerido con *PstI* y *NotI*. El fragmento de vector de 5.193
20 bp de pNNB194 y el fragmento de 1.306 bp que soporta el gen neo de pBEST501 fueron aislados de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos aislados fueron ligados entre sí y usados para transformar células competentes SURE de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes resistentes a la ampicilina fueron seleccionados en 2X placas de YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. ADN plásmido fue aislado de un tal transformante usando el QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN Inc.,
25 Valencia, CA), y el plásmido fue verificado por digestión con *Nsil* y *NotI*. Este plásmido fue designado pNNB194neo (Figura 23).

[0232] El plásmido pNNB194neo fue digerido con *SacI*/*NotI* y tratado con T4 ADN polimerasa y dNTPs para generar extremos romos usando protocolos estándar. Plásmido pPL2419 (patente estadounidense n°. 5,958,728) fue digerida con
30 EC/136II. El fragmento de vector de 6,478 bp de pNNB194neo y el fragmento de 562 bp de soporte onT de pPL2419 fueron aislados de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X gel TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados de gel fueron ligados entre sí y usados para transformar células SURE de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes resistentes a la ampicilina fueron seleccionados en 2X placas YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C. ADN plásmido fue aislado de un tal transformante usando el
35 QIAGEN Plasmid Kit, y el plásmido fue verificado por digestión con *Nsil*, *SacI*, y *Bscl*. Este plásmido fue designado pNNB194neo-oriT (Figura 24).

[0233] Plásmido pNNB194neo-oriT fue digerido con *BamHI* y tratado con T4 ADN polimerasa y dNTPs para generar extremos romos usando protocolos estándar. El plásmido digerido fue purificado en gel de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X
40 TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado fue tratado con T4 ADN ligasa y usado para transformar células SURE de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes

resistentes a la ampicilina fueron seleccionados en 2X placas YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C. ADN plásmido fue aislado de un tal transformante usando el QIAGEN Plasmid Kit, y la interrupción del sitio BamHI fue confirmada por digestión con *BamHI* y *ScaI*. El plásmido resultante fue designado pShV3 (Figura 25).

5 [0234] El plásmido pShV2,1-amyEΔ (patente estadounidense n°. 5,958,728) fue digerida con *SfiI* y *NotI*, y el fragmento de vector de 8696 bp fue purificado en gel de un gel de agarosa al 0,8%-0,5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. Para insertar un sitio *BamHI* entre los sitios *SfiI* y *NotI* de pShV2,1-amyEΔ, un enlazador sintético fue construido de la siguiente manera: los cebadores 62 y 63 fueron anillados mezclando 50 µM de cada uno, hirviendo la mezcla, y permitiendo a la mezcla refrescarse lentamente.

10 Cebador 62: 5'-GGGCCGGATCCGC-3' (SEC ID n°: 76)

Cebador 63: 3'-ATTCCCGGCCTAGGCGCCGG-5' (SEC ID n°: 77)

[0235] El vector pShV2,1-amyEΔ purificado y oligonucleótidos anillados fueron ligados entre sí y usados para transformar células competentes SURE de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes resistentes al cloranfenicol fueron seleccionados en placas LB suplementadas con 30 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. ADN plásmido fue aislado de un tal transformante usando el QIAGEN Plasmid Kit, y la inserción del sitio BamHI fue confirmada por digestión con BamHI. Este plásmido fue designado pShV2,1-amyEΔB (Figura 26).

20 [0236] Plásmidos pShV3 y pShV2,1-amyEΔB fueron digeridos con *Sall/HindIII*. Un fragmento de vector de 7033 bp de pShV3 y un fragmento de 1031 bp llevando amyEΔ de pShV2,1-amyEΔ fueron purificados en gel de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados en gel fueron ligados entre sí y usados para transformar células SURE de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes resistentes a la ampicilina fueron seleccionados en 2X placas YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. ADN plásmido fue aislado de un tal transformante usando el QIAGEN Plasmid Kit, y el plásmido fue verificado por digestión con *Sall* y *HindIII*. Este plásmido fue designado pShV3A (Figura 27).

30 [0237] El plásmido pMRT032 fue digerido con *KpnI/XbaI*, llenado con ADN polimerasa de fragmento Klenow en presencia de dNTPs, y un fragmento de aproximadamente 1000 bp fue aislado de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante. Este fragmento fue clonado en plásmido pShV3A digerido con *EcoRV*, y transformado en células XL1 Blue de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml tras la incubación a 37°C durante 16 horas. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE por análisis de restricción con *SacI/SphI*. El plásmido resultante fue designado pMRT036 (Figura 28).

35 [0238] Plásmido pMRT036 fue digerido con *Sall/HindIII*, llenado con ADN polimerasa de fragmento Klenow en presencia de dNTPs, ligado y transformado en células XL1 Blue de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina tras la incubación a 37°C durante 16 horas. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE por análisis de restricción con *SacI/XbaI*, *PstI* y *NdeI*. El plásmido resultante fue designado pMRT037 (Figura 29).

[0239] El fragmento estabilizador scBAN/cryIIIA del plásmido pDG268Δneo-cryIIIAstab/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue aislado de un gel de agarosa al 2%-0.5X TBE como un fragmento *SfiI/SacI* usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, ligado al plásmido pMRT037 digerido con *SfiI/SacI*, y transformado en células XL1 Blue de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml tras la incubación a 37°C durante 16 horas. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE por análisis de restricción con *PstI*. El plásmido resultante fue designado pMRT041 (Figura 30).

[0240] Plásmidos pMRT041 y pCJ791 fueron digeridos con *EcoRI/HindIII*. Un fragmento de aproximadamente 1300 bp de pMRT041 y un fragmento de aproximadamente 4500 bp de pCJ791 fueron aislados de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, ligados, y transformados en células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4. Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 30°C durante 24-48 horas. ADN plásmido de diferentes transformantes fue aislado usando columnas QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y verificado en un gel de agarosa al 0.8% -0.5X TBE por análisis de restricción con *Sac* y *EcoRI/HindIII*. El plásmido resultante fue designado pMRT064.1 (Figura 31).

[0241] El sitio *SacI* en la posición 2666 en el plásmido pMRT064.1 fue delecionado por SOE usando pares de cebador 64 y 65, y pares de cebador 66 y 67 mostrados más abajo. Amplificación de PCR fue conducida en reacciones de 50 µl compuestas por 1 ng de pMRT064.1 ADN, 0.4 µM de cada cebador, 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos; 25 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 52°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE. Los fragmentos previstos fueron aproximadamente 400 y 800 bp, respectivamente. El fragmento final para clonar de nuevo en pMRT064.1 fue amplificado usando los cebadores 64 y 67. Este fragmento fue clonado en vector pCR2.1 usando el TA-TOPO Cloning Kit. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg/ml ampicilina tras la incubación a 37°C durante 16 horas. Transformantes que llevan el plásmido correcto fueron verificados por secuenciación del ADN usando cebadores M13 inverso y directo, y los cebadores 65, 67, y 68. Este plásmido fue designado pMRT068 (Figura 32), y fue transformado además en células DM1 *E. coli* (Stratagene, Inc., la Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml.

Cebador 64: 5'-GGAAATTATCGTGATCAAC-3' (SEC ID n°: 78)

Cebador 65: 5'-GCACGAGCACTGATAAATATG-3' (SEC ID n°: 79)

Cebador 66: 5'-CATATTTATCAGTGCTCGTGC -3'(SEQ ID N°: 80)

Cebador 67: 5'-TCGTAGACCTCATATGC-3' (SEC ID n°: 81)

Cebador 68: 5'-GTCGTAAACCGTGTGC-3' (SEC ID n°: 82)

[0242] Los sitios *SacI* en las posiciones 5463 y 6025 en el plásmido pMRT064.1 fueron eliminados usando amplificación por PCR con los cebadores 69 y 70, y usando las condiciones de PCR anteriormente descritas. El fragmento resultante fue clonado en el vector pCR2.1 usando el TA-TOPO Cloning Kit (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Transformantes fueron

seleccionados en 2X placas agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml tras la incubación a 37°C durante 16 horas. Transformantes que llevan el plásmido correcto fueron verificados por secuenciación del ADN usando cebadores M13 inverso y directo. Este constructo fue designado pMRT069 (Figura 33).

Cebador 69: 5'-CTAGAGGATCCCCGGGTACCGTGCTCTGCCTTTTAGTCC-3' (SEC ID n°: 83)

5 Cebador 70: 5'-GTACATCGAATTCGTGCTCATTATTAATCTGTTCAGC-3' (SEC ID n°: 84)

[0243] Los plásmidos pMRT068 y pMRT064.1 fueron digeridos con *Bc//Accl*. Un fragmento de aproximadamente 1300 bp de pMRT068 y un fragmento de aproximadamente 3800 bp de pMRT064.1 fueron aislados de un gel de agarosa al 0.8% -0.5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, ligados, y transformados en células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4. Transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 30°C durante 24-48 horas. Transformantes que llevan el plásmido correcto fueron identificados en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE por análisis de restricción con *SacI* y *EcoRI//AvaI*. El constructo resultante fue designado pMRT071 (Figura 34).

15 [0244] Plásmidos pMRT071 y pMRT069 fueron digeridos con *AvaI/EcoRI*. El fragmento de 578 bp de pMRT069 y el fragmento de 4510 bp de pMRT071 fueron aislados de un gel de agarosa al 0.8% -0.5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, ligados, y transformados en células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4. Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 30°C durante 24-48 horas. Transformantes que llevan el plásmido correcto fueron identificados en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE por análisis de restricción con *SacI*. El constructo resultante fue designado pMRT074 (Figura 35).

25 [0245] El plásmido pMRT084 descrito en el Ejemplo 11 fue digerido con *SacII/NdeI*, tratado con T4 ADN polimerasa, ligado, y transformado en células XL1 Blue de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml tras la incubación a 37°C durante 16 horas. Transformantes que llevan el plásmido correcto fueron identificados en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X gel TBE por análisis de restricción con *DraI*. El plásmido resultante fue denominado pMRT120 (Figura 36).

30 [0246] El plásmido pMRT074 fue digerido con *HindIII*, tratado con ADN polimerasa de fragmento Klenow, y digerido con *EcoRI*. El plásmido pMRT120 fue digerido con *EcoRI/Ec/1361II*. Un fragmento de aproximadamente 600 bp de pMRT120 y un fragmento de aproximadamente 4300 bp de pMRT074 fueron aislados de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, ligados, y transformados en células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4. Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 30°C durante 24-48 horas. Los transformantes que llevan el plásmido correcto fueron identificados en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE por análisis de restricción con *SspI*. El constructo resultante fue designado pMRT122 (Figura 37).

40 [0247] Plásmido pMRT122 fue transformado en células competentes de *Bacillus subtilis* A164Δ5. Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 30°C durante 24-48 horas. El plásmido fue introducido en el cromosoma de *Bacillus subtilis* A164Δ5 via recombinación homóloga en el locus *cypX* incubando una placa recién estriada de células de *Bacillus subtilis* A164A5

(pMRT086) a 45°C durante 16 horas y seleccionando para colonias de crecimiento saludables. ADN genómico fue aislado de esta cepa usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante y usado para transformar *Bacillus subtilis* RB187 (Ejemplo 9). Los transformantes fueron seleccionados en placas TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 45°C durante 16 horas. A esta temperatura, el replicon pE194 es incapaz de replicarse. Las células son capaces de mantener la resistencia a la eritromicina sólo manteniendo el plásmido en el cromosoma bacteriano.

[0248] El plásmido fue eliminado del cromosoma via recombinación homóloga dando como resultado la delección de una parte del gen *cypX* en el cromosoma creciendo los transformantes en un medio Luria-Bertani (LB) sin selección a la temperatura permisiva de 34°C para muchas generaciones. A esta temperatura el origen de replicación pE194 está activo y en realidad promueve la escisión del plásmido del cromosoma (Molecular Biological Methods for Bacillus, editado por C.R. Harwood y S.M. Cutting, 1990, John Wiley and Sons Ltd.).

[0249] Después de diferentes generaciones de excrecencia las células fueron colocadas en placas de LB agar no selectivas y colonias que habían perdido el plásmido y que ahora habían sido eliminadas con *cypX* y que producían ácido hialurónico fueron identificadas de la siguiente manera: (1) parches de célula fueron "mojados" cuando se colocaron en placas mínimas indicando la producción de ácido hialurónico, (2) sensibilidad de eritromicina indicó pérdida del plásmido basado en pE194, y (3) PCR confirmó la presencia de la delección de *cypX* de 800 bp en la cepa de interés usando los cebadores 34 y 45.

[0250] ADN cromosómico de delecionantes de *cypX* potenciales fue aislado usando los equipos de PCR REDextract-N-Amp™ Plant de la siguiente manera: colonias de *Bacillus* individuales fueron inoculadas en 100 µl de solución de extracción, incubadas a 95°C durante 10 minutos, y luego diluidas con un igual volumen de solución de dilución. PCR fue realizada usando 4 µl de ADN extraído conjuntamente con la mezcla reactiva de PCR REDextract-N-Amp™ y los cebadores deseados según las instrucciones del fabricante, usando condiciones de ciclo de PCR como se describe en el ejemplo 5. Los productos de reacción de PCR fueron visualizados usando un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE. La cepa verificada fue designada *Bacillus subtilis* RB197.

Ejemplo 13: Construcción de *Bacillus subtilis* RB200

[0251] El gen *cypX* de *Bacillus subtilis* RB192 fue eliminado usando los mismos métodos descritos en el Ejemplo 9 para *Bacillus subtilis* RB187. La cepa resultante fue designada *Bacillus subtilis* RB200.

Ejemplo 14: Construcción de *Bacillus subtilis* RB202

[0252] *Bacillus subtilis* A164A5A*cypX* fue construido de la siguiente manera: plásmido pMRT122 (Ejemplo 12) fue transformado en células competentes de *Bacillus subtilis* A16405. Transformantes fueron seleccionados en placas de agar TBAB suplementadas con 1 µg de eritromicina y 25 µg de lincomicina por ml tras la incubación a 30°C durante 24-48 horas. El plásmido fue introducido en el cromosoma de *Bacillus subtilis* A164Δ5 via recombinación homóloga en el locus *cypX* incubando una placa recién estriada de células de *Bacillus subtilis* A164Δ5 (pMRT086) a 45°C durante 16 horas y seleccionando colonias en crecimiento saludables. El plásmido fue eliminado del cromosoma via recombinación homóloga dando como resultado la delección de una parte del gen *cypX* en el cromosoma creciendo los transformantes en medio Luria-Bertani (LB) sin selección a la temperatura permisiva de 34°C para muchas generaciones. A esta temperatura el origen pE194 de replicación está activo y en realidad promueve la escisión del plásmido del cromosoma (Molecular

Biological Methods for Bacillus, editado por C.R. Harwood y S.M. Cutting, 1990, John Wiley and Sons Ltd.). Después de varias generaciones de excrecencia de las células fueron colocadas en placas de LB agar no selectivas y colonias que habían perdido el plásmido y de las que se había eliminado ahora *cypX* fueron identificadas de la siguiente manera: (1) sensibilidad de eritromicina indicó pérdida del plásmido basado en pE194, y (2) PCR confirmó la presencia de la delección de *cypX* de 800 bp en la cepa de interés usando cebadores 34 y 45 como se ha descrito anteriormente. La cepa verificada fue designada *Bacillus subtilis* A164Δ5_ *cypX*.

[0253] *Bacillus subtilis* A164Δ5AcypX fue hecho competente y transformado con ADN genómico de *Bacillus subtilis* TH1 (Ejemplo 7) aislado usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Transformantes fueron seleccionados en placas TBAB conteniendo 5 µg de cloranfenicol por ml a 37°C. El integrante hasA/hasB/hasC/hasD de *Bacillus subtilis* A164Δ5_ *cypX* fue identificado por su fenotipo "mojado" y se designó *Bacillus subtilis* RB201. El gen *cat* fue eliminado de *Bacillus subtilis* RB201 usando el mismo método descrito en el Ejemplo 9. La cepa resultante fue designada *Bacillus subtilis* RB202.

15 **Ejemplo 15: Construcción de *Bacillus subtilis* MF002 (*tuaD/gtaB*)**

[0254] El plásmido pHA3 (ejemplo 2, Figura 9) fue digerido con Asp718. El plásmido digerido fue luego embotado inactivando primero la enzima de restricción a 85°C durante 30 minutos. El embotamiento fue realizado añadiendo 0.5 µl de 10 mM cada dNTPs, 1 µl de 1 U/µl T4 polimerasa e incubando a 11 °C durante 10 minutos. Finalmente la polimerasa fue inactivada incubando la reacción a 75°C durante 10 minutos. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento del plásmido más pequeño de aproximadamente 2522 bp fue luego purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado (*tuaD/gtaB*) fue luego ligado con el vector de ADN descrito abajo.

25 [0255] El plásmido pDG268MCSAneo/scBAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido con EC/136II. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento de plásmido más grande de aproximadamente 6800 bp fue purificado en gel de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

30 [0256] El vector recuperado e inserto de ADN fueron ligados usando el Rapid DNA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. Antes de la transformación en *Bacillus subtilis*, la ligación anteriormente descrita fue linealizado usando *ScaI* para asegurar integración de doble reticulación en el cromosoma mejor que la integración de reticulación única en el cromosoma. Células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4 fueron transformadas con la ligación digerida con la enzima de restricción *ScaI*.

35 [0257] Transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados en placas de TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml. Para visualizar la integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE*, transformantes primarios de *Bacillus subtilis* fueron parcheados en placas TBAB suplementadas con 6 µg de neomicina por ml y en placas TBAB suplementadas con 5 µg de cloranfenicol por ml para aislar transformantes sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol.

40

[0258] ADN cromosómico de transformantes de *Bacillus subtilis* sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol 168Δ4 fueron aislados usando equipos de PCR REDextract-N-Amp™ Plant (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) de la siguiente manera: colonias de *Bacillus* individuales fueron inoculadas en 100 μl de solución de extracción, incubadas a 95°C durante 10 minutos, y luego diluidas con un igual volumen de solución de dilución. PCR fue realizada usando 4 μl de ADN
5 extraído conjuntamente con la mezcla de reacción PCR REDextract-N-AMP y los cebadores deseados según las instrucciones del fabricante, con las condiciones de ciclo de PCR descritas en ejemplo 5.

[0259] Amplificaciones de PCR fueron realizadas en estos transformantes usando los oligonucleótidos sintéticos descritos abajo para confirmar la ausencia/presencia e integridad de los genes *hasA*, *gtaB*, y *tuaD* del operón de los transformantes
10 de *Bacillus subtilis*. Cebadores 3 y 8 fueron usados para confirmar la ausencia del gen *hasA*, cebador 71 y cebador 15 para confirmar la presencia del gen *tuaD*, y los cebadores 20 y 71 para confirmar la presencia del gen *gtaB*. Productos de reacción de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE. La cepa verificada, un integrante de *Bacillus subtilis* 168Δ4 *hasA/tuaD/gfaB*, fue designada *Bacillus subtilis* RB176.

Cebador 71: 5'-AACTATTGCCGATGATAAGC-3' (se enlaza ascendentemente de *tuaD*) (SEC ID N°: 85)

[0260] ADN genómico fue aislado de los transformantes resistentes al cloranfenicol, y sensibles a la neomicina de *Bacillus subtilis* RB176 usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. El ADN genómico de *Bacillus subtilis* RB176 fue usado para transformar *Bacillus subtilis* A164Δ5 competentes. Transformantes fueron seleccionados en placas TBAB conteniendo 5 μg de cloranfenicol por ml, y crecidos a 37°C. Un integrante de *Bacillus subtilis* A164Δ5
20 *tuaD/gtaB* fue designado *Bacillus subtilis* RB177.

[0261] El gen *cat* fue eliminado en la cepa de *Bacillus subtilis* RB177 usando el método descrito en el Ejemplo 9. La cepa resultante fue designada *Bacillus subtilis* MF002.

25 **Ejemplo 16: Construcción del plásmido de integración pel pRB162**

[0262] Plásmido pDG268MCSΔneo/scBAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido doblemente con *SacI* y *AatII*. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 6193bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el inserto de ADN descrito abajo.

[0263] Los fragmentos 5' y 3' de un gen de pectato liasa de *Bacillus subtilis* (pel, número de acceso BG10840, SEC ID NOs. 86 [secuencia de ADN] y 87 [secuencia de aminoácidos deducida]) fue amplificada por PCR de *Bacillus subtilis* 168 (BGSC 1A1, *Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, OH) usando cebadores 72 (introduce el sitio de restricción de *SpeI* 5') y 73 (introduce el sitio de restricción de *SalI* 3') para el fragmento pel 5' y cebadores 74 (introduce los sitios de restricción de *SacI*/*BamHI* 5') y 75 (introduce los sitios de restricción de *NotI*/*AatII* 3') para el fragmento pel 3' :
35

Cebador 72:

5'-ACTAGTAATGATGGCTGGGGCGCGTA-3' (SEC ID n°: 88)

Cebador 73:

5'-GTTCGACATGTTGTCGTATTGTGAGTT-3' (SEC ID n°: 89)

40 Cebador 74:

5'-GAGCTCTACAACGCTTATGGATCCGCGGCCGCGGGCACACACATCTGGAT-3' (SEC ID n°: 90)

Cebador 75:

5'-GACGTCAGCCCGTTTGCAGCCGATGC-3' (SEC ID nº: 91)

5 [0264] Amplificaciones de PCR fueron realizadas por triplicado en reacciones de 30 µl compuestas por 50 ng de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* 168, 0.4 µM cada uno de par de cebador 72/73 para el fragmento pel 5' o par de cebador 74/75 para el fragmento pel 3' , 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 1X Tampón PCR II con 2.5 mM MgCl₂, y 2.5 unidades de ADN polimerasa AmptiTaq gold™. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador RoboCycler 40 programado durante 1 ciclo a 95°C durante 9 minutos; 3 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 52°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; 27 ciclos cada uno a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados usando un gel de agarosa al 0.8% -0.5X TBE. Los fragmentos previstos fueron aproximadamente 530 bp para el fragmento pel 5' y 530 bp para el fragmento pel 3' .

15 [0265] Los fragmentos de PCR pel 5' de 530 bp y pel 3' de 530 bp fueron clonados en pCR2.1 usando el TA-TOPO Cloning Kit y transformados en células competentes OneShoT™ de *E.coli* según las instrucciones de los fabricantes. Los transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml incubado a 37°C. ADN plásmido de estos transformantes fue purificado usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y la secuencia de ADN de los insertos confirmados por secuenciación del ADN usando los cebadores anteriormente descritos (cebadores 72 y 73 para pel 5' y cebadores 74 y 75 para pel 3'). Los plásmidos que contienen fragmentos de PCR de 530 bp y 530 bp fueron designados pCR2.1-pel 5' y pCR2.1-pel3'. respectivamente (Figuras 38 y 39, respectivamente).

20 [0266] El plásmido pCR2.1-pel3' fue digerido doblemente con SacI y AatII. El fragmento de plásmido menor de aproximadamente 530 bp fue purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8% - 0.5X TBE según las instrucciones del fabricante.

25 [0267] El vector recuperado (pDG268MCSAneo/scBAN) e inserto de ADN (3' pel) fueron ligados usando el Rapid DNA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli* (Stratagene, Inc., la Jolla, CA). Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C.

30 [0268] ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión SacI y AatII en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento pel 3' SacI/AatII de aproximadamente 530 bp y fue designado pRB161 (Figura 40).

35 [0269] El plásmido pRB161 fue digerido doblemente con SpeI y SaI. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 5346 bp fue purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el inserto de ADN descrito abajo.

40 [0270] Plásmido pCR2.1-pel5' fue digerido doblemente con SpeI y SaI. El fragmento de plásmido menor de aproximadamente 530 bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante.

[0271] El vector recuperado (pDG268MCS neo/scBAN/pel 3') y ADN del inserto (pel 5') fueron ligados usando el Rapid DNA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli* (Stratagene, Inc., la Jolla, CA). Los transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml.

[0272] ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión SpeI y Sall en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento pel 5' SpeI/Sall de aproximadamente 530 bp y fue designado pRB162 (Figura 41).

Ejemplo 17: Construcción de pRB156

[0273] Plásmido pHA7 (ejemplo 4, Figura 13) fue digerido con *HpaI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante y finalmente digerido con Asp718. El plásmido digerido doblemente fue luego embotado inactivando primero la enzima de restricción a 85°C durante 30 minutos. El embotamiento fue realizado añadiendo 0.5 µl de 10 mM cada dNTPs y 1 µl de 1 U/µl de T4 polimerasa e incubando a 11°C durante 10 minutos. La polimerasa fue luego inactivada incubando la reacción a 75°C durante 10 minutos. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 8600 bp fue luego purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado (pDG268Δneo-cryIII_Astab/sehasA) fue luego religado usando el Rapid DNA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante.

[0274] La mezcla de ligación fue transformada en células competentes SURE de *E. coli* (Stratagene, Inc., la Jolla, CA). Los transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml a 37°C. ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión ScaI en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la presencia de un fragmento de aproximadamente 8,755 bp y fue designado pRB156 (Figura 42).

Ejemplo 18: Construcción de *Bacillus subtilis* MF009

[0275] El gen *hasA* bajo control del promotor scBAN fue introducido en el locus del gen de pectato liasa (pel) de *Bacillus subtilis* MF002 para generar *Bacillus subtilis* MF009.

[0276] El plásmido pRB156 fue digerido con ScaI. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *NotI*. El fragmento de plásmido menor de aproximadamente 1,377 bp fue purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0,8% - 0,5X TBE según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado fue luego ligado con el vector de ADN descrito abajo.

[0277] El plásmido pRB162 (ejemplo 16, Figura 41) fue digerido con *NotI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *SacI*. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 5850 bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el

inserto de ADN anteriormente descrito.

[0278] La mezcla de ligación fue transformada directamente en células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4. Los transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados en placas de TBAB suplementadas con 5 μg de cloranfenicol por ml a 37°C. Para visualizar la integración del plásmido por doble reticulación en el locus pel, los transformantes primarios de *Bacillus subtilis* fueron parcheados en placas de TBAB suplementadas con 6 μg de neomicina por ml y en placas de TBAB suplementadas con 5 μg de cloranfenicol por ml. La integración del plásmido por doble reticulación en el locus pel no incorpora el gen de resistencia a la neomicina y por lo tanto hace la cepa sensible a la neomicina. Usando esta visualización de placa, transformantes sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol fueron aislados.

[0279] ADN genómico fue aislado de los transformantes sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* 168Δ4 usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante. Este ADN genómico fue usado para transformar *Bacillus subtilis* MF002 competente (Ejemplo 15). Los transformantes fueron seleccionados en placas de TBAB conteniendo 5 μg de cloranfenicol por ml y crecidos a 37°C. El integrante hasA y tuaD/gtaB de *Bacillus subtilis* A164Δ5 fue identificado por su fenotipo "mojado" y designado *Bacillus subtilis* MF009.

Ejemplo 19: Construcción de *Bacillus subtilis* MF010

[0280] El plásmido pDG268MCSΔneo/BAN/Sav (patente estadounidense n°. 5,955,310) fue digerido con NotI. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con SfiI. El fragmento de plásmido menor de aproximadamente 185 bp fue purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado fue luego ligado con el vector de ADN descrito abajo.

[0281] El plásmido pRB162 (ejemplo 16, Figura 41) fue digerido con NotI. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con SfiI. El fragmento de plásmido mayor de aproximadamente 5747 bp fue purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8% -0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el inserto de ADN anteriormente descrito.

[0282] El vector recuperado e inserto de ADN fueron ligados usando el Rapid DNA Cloning Kit según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación fue transformada en células competentes Blue XLI de *E. coli*. Transformantes fueron seleccionados en 2X placas de agar YT suplementadas con 100 μg de ampicilina por ml.

[0283] ADN plásmido fue purificado de diferentes transformantes usando un robot QIAGEN según las instrucciones del fabricante y analizado por digestión con BamHI en un gel de agarosa al 0.8% usando 0.5X tampón TBE. El plásmido correcto fue identificado por la linealización del plásmido que proporciona un fragmento de aproximadamente 7,156 bp y fue designado pRB164 (Figura 43).

[0284] El plásmido pR8156 (ejemplo 17, Figura 42) fue digerido con SacI. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con NotI. El plásmido más

pequeño, fragmento de aproximadamente 1377 bp fue purificado de gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El inserto de ADN recuperado fue luego ligado con el vector de ADN descrito abajo.

5 [0285] El plásmido pRB164 fue digerido con *NotI*. El plásmido digerido fue luego purificado usando un QIAquick DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante, y finalmente digerido con *SacI*, el fragmento del plásmido mayor de aproximadamente 5922 bp fue purificado en gel usando un QIAquick DNA Gel Extraction Kit de un gel de agarosa al 0.8%-0.5X TBE según las instrucciones del fabricante. El ADN del vector recuperado fue luego ligado con el inserto de ADN anteriormente descrito.

10

[0286] Esta mezcla de ligación fue transformada directamente en células competentes de *Bacillus subtilis* 168Δ4. Transformantes resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* fueron seleccionados en placas de TBAB suplementadas con 5 μg de cloranfenicol por ml 37°C. Para visualizar la integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE*, transformantes primarios de *Bacillus subtilis* fueron parcheados en placas de TBAB suplementadas con 6 μg de neomicina por ml y en placas de TBAB suplementadas con 5 μg de cloranfenicol por ml. Integración del plásmido por doble reticulación en el locus *amyE* no incorpora el gen de resistencia a la neomicina y por lo tanto hace la cepa sensible a la neomicina. Usando esta visualización de placa, los transformantes sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol fueron aislados.

15

20 [0287] ADN genómico fue aislado de transformantes sensibles a la neomicina y resistentes al cloranfenicol de *Bacillus subtilis* 168Δ4 usando una columna QIAGEN tip-20 según las instrucciones del fabricante, este ADN genómico fue usado para transformar *Bacillus subtilis* MF002 competentes (Ejemplo 15). Los transformantes fueron seleccionados en placas mínimas conteniendo 5 μg de cloranfenicol por ml y crecidas a 37°C durante 16 horas. Un integrante BAN/hasA y scBAN/tuaD/gta de *Bacillus subtilis* A164Δ5 fue identificado por su fenotipo "mojado" y designado *Bacillus subtilis* MF010.

25

Ejemplo 20: Fermentaciones

[0288] La capacidad de las cepas de *Bacillus subtilis* listadas en la tabla 1 para producir ácido hialurónico fue evaluada bajo diversas condiciones de crecimiento.

Tabla 1

Cepa de <i>B. subtilis</i>	promotor/complemento genético	catΔ	cypXΔ
RB161	SeBAN/hasNtuaD/gtaB	no	no
RB163	scBAN/hasA/tuaD/gcaD	no	no
TH-1:	scBANhasA/hasB/hasC/hasD	no	no
RB184	scBAN/haSA/tuaD	no	no
RB187	scBAN/hasA/tuaD/gtaB	Sí	no
RB192	scBAN/haSA/tuaD	Sí	no
RB194	scBAN/hasA/tuaD/gtaB	Sí	Sí
RB197	scBAN/hasA/tuaD/gtaB	Sí	Sí
RB200	seBAN/hasA/tuaD	Sí	Sí
RB202	scBAN/hasA/hasB/hasC/hasD	Sí	Sí

MF009	scBAN/tuaD/gtaB	no	no
	scBAN/hasA		
MF010	scBAN/tuaD/gtaB BAN/hasA	no	no

[0289] Las cepas de *Bacillus subtilis* fueron fermentadas en fermentadores pequeños estándares en un medio compuesto por litro de 6,5 g de KH_2PO_4 , 4,5 g de Na_2HPO_4 , 3,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g de Na_3 -citrato- $2\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6,0 ml de Mikrosoy- 2, 0,15 mg de biotina (1 ml de 0,15 mg/ml etanol), 15. 0 g de sacarosa, 1,0 ml de SB 2066, 2,0 ml de P2000., 0,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El medio fue pH 6,3 a 6,4 (sin ajustar) antes de someter a autoclave. El $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fue añadido después del autoclave.

[0290] El medio de siembra usado fue B-3, es decir, Agar-3 sin agar; o medio "S/S-1". El medio de agar-3 fue compuesto por litro de 4.0 g de caldo nutritivo, 75 g de proteína hidrolizada, 3.0 g de extracto de levadura. 1.0 g de glucosa, y 2% agar. El pH no fue ajustado; el pH antes del autoclave fue aproximadamente 6.8 después del autoclave aproximadamente pH 7.7.

[0291] El medio de matraz de siembra de sacarosa/soja (S/S-1) fue compuesto por litro de 65 g de sacarosa, 35 g de harina de soja, 2 g de Na_3 - citrato $2\text{H}_2\text{O}$, 4 g de KH_2PO_4 , 5 g de Na_2HPO_4 , y 6 ml de elementos traza; el medio fue ajustado pH a aproximadamente 7 con NaOH; después de dispensar el medio en matraces. 0.2% de aceite vegetal se añadió para suprimir la formación de espuma. Elementos traza fueron compuestos por litro de 100 g de ácido cítrico- H_2O 20 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 2 g de ZnCl_2 .

[0292] El pH fue ajustado a 6.8 - 7.0 con amonio antes de la inoculación, y controlado luego a $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ con amonio añadido H_3PO_4 . La temperatura, fue mantenida a 37°C . Agitación fue a un máximo de 1300 r.p.m. Usando dos propulsores de rushton de 6 aspas de 6 cm de diámetro en un tanque de 3 litros con volumen inicial de 1.5 litros, la aireación tuvo un máximo de 1.5 VVM.

[0293] Para la alimentación, una simple solución de sacarosa fue usada. La alimentación comenzó aproximadamente 4 horas después de la inoculación, cuando el oxígeno disuelto (D.O.) estaba siendo todavía conducido hacia abajo (es decir, antes de la depleción de sacarosa). El índice de alimentación fue desnivelado linealmente de 0 a aproximadamente 6 g sacarosa/ L_0 hr sobre un intervalo temporal de 7 horas. Un índice de alimentación inferior, desnivelado linealmente de 0 a aproximadamente 2 g sacarosa/ L_0 hr, fue también usado en algunas fermentaciones.

[0294] La viscosidad fue notable aproximadamente a las 10 horas y a las 24 horas, la viscosidad fue muy alta, causando que el D.O. alcanzara el punto más bajo. La viscosidad final alcanzó 3,220 cP. El desarrollo de la masa celular alcanzó un casi máximo (12 a 15 g/litro) a las 20 horas. Células fueron retiradas diluyendo 1 parte de cultivo con 3 partes de agua, mezclándolo bien y centrifugando a aproximadamente $30,000 \times g$ para producir un sobrenadante claro y granulado celular, que se puede lavar y secar.

[0295] Ensayos de concentración de ácido hialurónico fueron realizados usando el método ELISA, basado en una proteína de enlace de hialuronano (proteína y equipos disponibles comercialmente de Seikagaku America, Falmouth, MA).

[0296] *Bacillus subtilis* RB 161 y RB163 fueron cultivados en fermentaciones discontinuas y de lote alimentado. En los

procesos de lote alimentado, el índice de alimentación fue variado entre cultivos de cepas de *Bacillus subtilis* RB163 y RB161. Ensayos de concentraciones de ácido hialurónico fueron otra vez realizados usando el método ELISA. Los resultados se proveen en la tabla 2.

Tabla 2

<i>Cepa y Condiciones de crecimiento</i>	<i>HA (rendimiento relativo) método ELISA</i>
RB-161 (hasA/tuaD/gtaB) Lote simple	0.7±0.1
RB-163 (hasA/tuaD/gcaD) Lote alimentado 6 g sacarosa/L ₀ hr	0.9 ±0.1
RB161 (hasA/tuaD/gtaB) Lote alimentado 6 g sacarosa/L ₀ hr	0.9 ±0.1
RB-163 (hasA/tuaD/gcaD) Lote alimentado 2 g sacarosa/L ₀ hr	1.0 ± 0.2
RB161 (hasA/tuaD/gtaB) Lote alimentado - 2 g sacarosa/L ₀ hr	1.0 ± 0.1

- 5 [0297] Los resultados de los ensayos de cultivo para la misma cepa a un índice de flujo continuo de 2 g/L sacarosa/L₀ hr en comparación con 6 g/L sacarosa/L₀ hr demostraron que un índice de alimentación de sacarosa más rápido no mejoró significativamente los títulos.
- 10 [0298] Un resumen de las cepas de *Bacillus* ejecutadas bajo las mismas condiciones (flujo continuo a aproximadamente 2 g sacarosa/L₀ hr, 37°C) se muestra en la figura 44. En la figura 44, valores ± indican desviación típica de datos de múltiples ejecuciones bajo las mismas condiciones. Datos sin valores ± son de única ejecución. Concentraciones de ácido hialurónico fueron determinadas usando el método de carbazol modificado (Bitter and Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334).
- 15 [0299] Un resumen de pesos moleculares promedio en peso de ácido hialurónico de valor máximo (MDa) obtenidos de la fermentación de las cepas de *Bacillus subtilis* recombinantes bajo las mismas condiciones (flujo continuo a aproximadamente 2 g sacarosa/L₀ hr, 37°C) se muestra en la figura 45. Pesos moleculares fueron determinados usando un ensayo GPC MALLS. Datos fueron reunidos de ensayos GPC MALLS usando el siguiente procedimiento. Cromatografía GPC-MALLS (permeación en gel o exclusión de tamaño) acoplada con dispersión de luz láser multi-ángulo) es muy usada
- 20 para caracterizar polímeros de peso molecular (PM) alto. La separación de polímeros se consigue por cromatografía pg,

basada en la subdivisión diferencial de moléculas de diferente PM entre eluyente y resina. El peso molecular medio de un polímero individual se determina por MALLS basado en la extensión/ángulo diferencial de dispersión de moléculas de diferente PM. Principios de GPC-MALLS y protocolos adecuados para ácido hialurónico son descritos por Ueno et al., 1988, Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual " y "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California). Una HPLC isocrática Agilent 1100, una columna Tosoh Biosep G6000 PWxl para la cromatografía pg, y un Wyatt Down EOS para los MALLS fueron usados. Un detector de índice de refracción Agilent G1362A fue enlazado hacia abajo de los MALLS para determinación de la concentración de eluato. Varios productos de ácido hialurónico comerciales con pesos moleculares conocidos sirvieron como estándares.

Depósito de Material biológico

[0300] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, y se le dio el siguiente número de acceso.

Depósito	Número de acceso	Fecha de depósito
E. coli XL10 Gold kan (pMRT106)	NRRL B-30536	12 de diciembre de 2001

[0301] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente a una determinada por el Comisario de Patentes y Marcas registradas para ser autorizado a ello conforme a 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo substancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según lo requerido por las leyes de patente extranjeras en países donde ejemplares de la solicitud en objeto, o su progenie son depositados. No obstante, debe ser entendido que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención en objeto en derogación de los derechos de patentes concedidas por acción gubernamental.

[0302] La invención reivindicada y descrita aquí no debe ser limitada en su alcance por las formas de realización específicas aquí descritas, ya que estas formas de realización se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. Cualquier forma de realización equivalente se destina a estar dentro del campo de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas descritas y mostradas aquí se hará aparente para los expertos en la técnica de la descripción precedente. Tales modificaciones están también destinadas a caer dentro del campo de las reivindicaciones anexas. En caso de conflicto, predominará la presente divulgación incluidas sus definiciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0303]

<110> Novozymes Biotech, Inc.

<120> Métodos para producir hialuronano en una célula huésped recombinante

<130> 10241.204-WO

<150> US 60/342,644

<151> 2001-12-21

5 <160> 108

<170> Versión de patentIn 3.1

<210> 1

10 <211> 1251

<212> ADN

<213> Streptococcus equisimilis

<220>

15 <221> CDS

<222> (1)..(1251)

<223>

<400> 1

atg	aga	aca	tta	aaa	aac	ctc	ata	act	gtt	gtg	gcc	ttt	agt	att	ttt	48
Met	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Leu	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Phe	Ser	Ile	Phe	
1				5					10					15		
tgg	gta	ctg	ttg	att	tac	gtc	aat	gtt	tat	ctc	ttt	ggt	gct	aaa	gga	96
Trp	Val	Leu	Leu	Ile	Tyr	Val	Asn	Val	Tyr	Leu	Phe	Gly	Ala	Lys	Gly	
			20					25					30			
agc	ttg	tca	att	tat	ggc	ttt	ttg	ctg	ata	gct	tac	cta	tta	gtc	aaa	144
Ser	Leu	Ser	Ile	Tyr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu	Leu	Val	Lys	
		35					40					45				
atg	tcc	tta	tcc	ttt	ttt	tac	aag	cca	ttt	aag	gga	agg	gct	ggg	caa	192
Met	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Tyr	Lys	Pro	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Gly	Gln	
	50					55					60					
tat	aag	gtt	gca	gcc	att	att	ccc	tct	tat	aac	gaa	gat	gct	gag	tca	240
Tyr	Lys	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Pro	Ser	Tyr	Asn	Glu	Asp	Ala	Glu	Ser	
65					70				75					80		
ttg	cta	gag	acc	tta	aaa	agt	gtt	cag	cag	caa	acc	tat	ccc	cta	gca	288
Leu	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Gln	Gln	Gln	Thr	Tyr	Pro	Leu	Ala	
			85					90					95			
gaa	att	tat	gtt	gtt	gac	gat	gga	agt	gct	gat	gag	aca	ggt	att	aag	336
Glu	Ile	Tyr	Val	Val	Asp	Asp	Gly	Ser	Ala	Asp	Glu	Thr	Gly	Ile	Lys	
			100					105					110			
cgc	att	gaa	gac	tat	gtg	cgt	gac	act	ggt	gac	cta	tca	agc	aat	gtc	384
Arg	Ile	Glu	Asp	Tyr	Val	Arg	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	Val	
		115					120					125				
att	gtt	cac	cgg	tca	gaa	aaa	aat	caa	gga	aag	cgt	cat	gca	cag	gcc	432
Ile	Val	His	Arg	Ser	Glu	Lys	Asn	Gln	Gly	Lys	Arg	His	Ala	Gln	Ala	
	130					135					140					

tgg gcc ttt gaa aga tca gac gct gat gtc ttt ttg acc gtt gac tca	480
Trp Ala Phe Glu Arg Ser Asp Ala Asp Val Phe Leu Thr Val Asp Ser	
145 150 155 160	
gat act tat atc tac cct gat gct tta gag gag ttg tta aaa acc ttt	528
Asp Thr Tyr Ile Tyr Pro Asp Ala Leu Glu Glu Leu Leu Lys Thr Phe	
165 170 175	
aat gac cca act gtt ttt gct gcg acg ggt cac ctt aat gtc aga aat	576
Asn Asp Pro Thr Val Phe Ala Ala Thr Gly His Leu Asn Val Arg Asn	
180 185 190	
aga caa acc aat ctc tta aca cgc ttg aca gat att cgc tat gat aat	624
Arg Gln Thr Asn Leu Leu Thr Arg Leu Thr Asp Ile Arg Tyr Asp Asn	
195 200 205	
gct ttt ggc gtt gaa cga gct gcc caa tcc gtt aca ggt aat att ctc	672
Ala Phe Gly Val Glu Arg Ala Ala Gln Ser Val Thr Gly Asn Ile Leu	
210 215 220	
gtt tgc tca ggc ccg ctt agc gtt tac aga cgc gag gtg gtt gtt cct	720
Val Cys Ser Gly Pro Leu Ser Val Tyr Arg Arg Glu Val Val Val Pro	
225 230 235 240	
aac ata gat aga tac atc aac cag acc ttc ctg ggt att cct gta agt	768
Asn Ile Asp Arg Tyr Ile Asn Gln Thr Phe Leu Gly Ile Pro Val Ser	
245 250 255	
atc ggt gat gac agg tgc ttg acc aac tat gca act gat tta gga aag	816
Ile Gly Asp Asp Arg Cys Leu Thr Asn Tyr Ala Thr Asp Leu Gly Lys	
260 265 270	
act gtt tat caa tcc act gct aaa tgt att aca gat gtt cct gac aag	864
Thr Val Tyr Gln Ser Thr Ala Lys Cys Ile Thr Asp Val Pro Asp Lys	
275 280 285	
atg tct act tac ttg aag cag caa aac cgc tgg aac aag tcc ttc ttt	912
Met Ser Thr Tyr Leu Lys Gln Gln Asn Arg Trp Asn Lys Ser Phe Phe	
290 295 300	
aga gag tcc att att tct gtt aag aaa atc atg aac aat cct ttt gta	960
Arg Glu Ser Ile Ile Ser Val Lys Lys Ile Met Asn Asn Pro Phe Val	
305 310 315 320	
gcc cta tgg acc ata ctt gag gtg tct atg ttt atg atg ctt gtt tat	1008
Ala Leu Trp Thr Ile Leu Glu Val Ser Met Phe Met Met Leu Val Tyr	
325 330 335	
tct gtg gtg gat ttc ttt gta gac aat gtc aga gaa ttt gat tgg ctc	1056
Ser Val Val Asp Phe Phe Val Asp Asn Val Arg Glu Phe Asp Trp Leu	
340 345 350	
agg gtt ttg gcc ttt ctg gtg att atc ttc att gtt gct ctt tgt cgt	1104
Arg Val Leu Ala Phe Leu Val Ile Ile Phe Ile Val Ala Leu Cys Arg	
355 360 365	
aat att cac tat atg ctt aag cac ccg ctg tcc ttc ttg tta tct ccg	1152
Asn Ile His Tyr Met Leu Lys His Pro Leu Ser Phe Leu Leu Ser Pro	
370 375 380	

ttt	tat	ggg	gta	ctg	cat	ttg	ttt	gtc	cta	cag	ccc	ttg	aaa	ttg	tat	1200
Phe	Tyr	Gly	Val	Leu	His	Leu	Phe	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	Tyr	
385					390					395					400	
tct	ctt	ttt	act	att	aga	aat	gct	gac	tgg	gga	aca	cgt	aaa	aaa	tta	1248
Ser	Leu	Phe	Thr	Ile	Arg	Asn	Ala	Asp	Trp	Gly	Thr	Arg	Lys	Lys	Leu	
				405					410					415		
tta																1251
Leu																

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

5 <213> Streptococcus equisimilis

<400> 2

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

	165	170	175
Asn Asp Pro Thr Val Phe Ala Ala Thr Gly His Leu Asn Val Arg Asn	180	185	190
Arg Gln Thr Asn Leu Leu Thr Arg Leu Thr Asp Ile Arg Tyr Asp Asn	195	200	205
Ala Phe Gly Val Glu Arg Ala Ala Gln Ser Val Thr Gly Asn Ile Leu	210	215	220
Val Cys Ser Gly Pro Leu Ser Val Tyr Arg Arg Glu Val Val Val Pro	225	230	235
Asn Ile Asp Arg Tyr Ile Asn Gln Thr Phe Leu Gly Ile Pro Val Ser	245	250	255
Ile Gly Asp Asp Arg Cys Leu Thr Asn Tyr Ala Thr Asp Leu Gly Lys	260	265	270
Thr Val Tyr Gln Ser Thr Ala Lys Cys Ile Thr Asp Val Pro Asp Lys	275	280	285
Met Ser Thr Tyr Leu Lys Gln Gln Asn Arg Trp Asn Lys Ser Phe Phe	290	295	300
Arg Glu Ser Ile Ile Ser Val Lys Lys Ile Met Asn Asn Pro Phe Val	305	310	315
Ala Leu Trp Thr Ile Leu Glu Val Ser Met Phe Met Met Leu Val Tyr	325	330	335
Ser Val Val Asp Phe Phe Val Asp Asn Val Arg Glu Phe Asp Trp Leu	340	345	350
Arg Val Leu Ala Phe Leu Val Ile Ile Phe Ile Val Ala Leu Cys Arg	355	360	365
Asn Ile His Tyr Met Leu Lys His Pro Leu Ser Phe Leu Leu Ser Pro	370	375	380
Phe Tyr Gly Val Leu His Leu Phe Val Leu Gln Pro Leu Lys Leu Tyr	385	390	395
Ser Leu Phe Thr Ile Arg Asn Ala Asp Trp Gly Thr Arg Lys Lys Leu	405	410	415

Leu

<210> 3
 <211> 49
 <212> ADN
 5 <213> Streptococcus equisimilis

 <400> 3
 gagctctata aaaatgagga gggaaccgaa tgagaacatt aaaaaacct 49

 10 <210> 4
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Streptococcus equisimilis

 15 <400> 4
 gttaacgaat tcagctatgt aggtaccta taataatftt ttacgtgt 48

 <210> 5
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Streptococcus equisimilis

 <400> 5
 gttgacgatg gaagtgctga 20
 25
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptococcus equisimilis
 30
 <400> 6
 atccgttaca ggtaatatcc 20

 <210> 7
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptococcus equisimilis

 <400> 7
 40 tccttttgta gcctatgga 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Streptococcus equisimilis

 <400> B
 tcagcacttc catcgtaac 20

 10 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptococcus equisimilis

 15 <400> 9
 ggatattacc tgtaacggat 20

 <210> 10
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Streptococcus equisimilis

 <400> 10
 tccatagggc taaaaagga 20
 25
 <210> 11
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1383)
 <223>
 35
 <400> 11

gtg	aaa	aaa	ata	gct	gtc	att	gga	aca	ggt	tat	gta	gga	ctc	gta	tca	48
Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Val	Ile	Gly	Thr	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Val	Ser	
1			5						10					15		
ggc	act	tgc	ttt	gcg	gag	atc	ggc	aat	aaa	gtt	gtt	tgc	tgt	gat	atc	96
Gly	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Ile	Gly	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Cys	Asp	Ile	
			20					25						30		
gat	gaa	tca	aaa	atc	aga	agc	ctg	aaa	aat	ggg	gta	atc	cca	atc	tat	144
Asp	Glu	Ser	Lys	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Asn	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Tyr	
			35				40						45			
gaa	cca	ggg	ctt	gca	gac	tta	gtt	gaa	aaa	aat	gtg	ctg	gat	cag	cgc	192
Glu	Pro	Gly	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Glu	Lys	Asn	Val	Leu	Asp	Gln	Arg	
	50					55					60					
ctg	acc	ttt	acg	aac	gat	atc	ccg	tct	gcc	att	cgg	gcc	tca	gat	att	240
Leu	Thr	Phe	Thr	Asn	Asp	Ile	Pro	Ser	Ala	Ile	Arg	Ala	Ser	Asp	Ile	
65					70					75					80	
att	tat	att	gca	gtc	gga	acg	cct	atg	tcc	aaa	aca	ggt	gaa	gct	gat	288
Ile	Tyr	Ile	Ala	Val	Gly	Thr	Pro	Met	Ser	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Asp	
			85					90						95		
tta	acg	tac	gtc	aaa	gcg	gcg	gcg	aaa	aca	atc	ggt	gag	cat	ctt	aac	336
Leu	Thr	Tyr	Val	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Thr	Ile	Gly	Glu	His	Leu	Asn	
			100					105						110		
ggc	tac	aaa	gtg	atc	gta	aat	aaa	agc	aca	gtc	ccg	gtt	gga	aca	ggg	384
Gly	Tyr	Lys	Val	Ile	Val	Asn	Lys	Ser	Thr	Val	Pro	Val	Gly	Thr	Gly	
		115					120					125				
aaa	ctg	gtg	caa	tct	atc	gtt	caa	aaa	gcc	tca	aag	ggg	aga	tac	tca	432

Lys	Leu	Val	Gln	Ser	Ile	Val	Gln	Lys	Ala	Ser	Lys	Gly	Arg	Tyr	Ser		
	130					135					140						
ttt	gat	gtt	gta	tct	aac	cct	gaa	tto	ctt	egg	gaa	ggg	tca	geg	att		480
Phe	Asp	Val	Val	Ser	Asn	Pro	Glu	Phe	Leu	Arg	Glu	Gly	Ser	Ala	Ile		
145					150					155					160		
cat	gac	acg	atg	aat	atg	gag	cgt	gcc	gtg	att	ggg	tca	aca	agt	cat		528
His	Asp	Thr	Met	Asn	Met	Glu	Arg	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Thr	Ser	His		
				165					170					175			
aaa	gcc	gct	gcc	atc	att	gag	gaa	ctt	cat	cag	cca	ttc	cat	gct	cct		576
Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Ile	Glu	Glu	Leu	His	Gln	Pro	Phe	His	Ala	Pro		
			180					185					190				
gtc	att	aaa	aca	aac	cta	gaa	agt	gca	gaa	atg	att	aaa	tac	gcc	gcg		624
Val	Ile	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Met	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ala		
		195					200					205					
aat	gca	ttt	ctg	gcg	aca	aag	att	tcc	ttt	atc	aac	gat	atc	gca	aac		672
Asn	Ala	Phe	Leu	Ala	Thr	Lys	Ile	Ser	Phe	Ile	Asn	Asp	Ile	Ala	Asn		
	210					215					220						
att	tgt	gag	cga	gtc	ggc	gca	gac	gtt	tca	aaa	gtt	gct	gat	ggg	gtt		720
Ile	Cys	Glu	Arg	Val	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	Lys	Val	Ala	Asp	Gly	Val		
225					230					235					240		
ggg	ctt	gac	agc	cgt	atc	ggc	aga	aag	ttc	ctt	aaa	gct	ggg	att	gga		768
Gly	Leu	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Leu	Lys	Ala	Gly	Ile	Gly		
				245					250					255			
ttc	ggc	ggg	tca	tgt	ttt	cca	aag	gat	aca	acc	gcg	ctg	ctt	caa	atc		816
Phe	Gly	Gly	Ser	Cys	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Ile		
			260					265					270				
gca	aaa	tcg	gca	ggc	tat	cca	ttc	aag	ctc	atc	gaa	gct	gtc	att	gaa		864
Ala	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Glu	Ala	Val	Ile	Glu		
		275					280					285					
acg	aac	gaa	aag	cag	cgt	gtt	cat	att	gta	gat	aaa	ctt	ttg	act	gtt		912
Thr	Asn	Glu	Lys	Gln	Arg	Val	His	Ile	Val	Asp	Lys	Leu	Leu	Thr	Val		
	290					295					300						
atg	gga	agc	gtc	aaa	ggg	aga	acc	att	tca	gtc	ctg	gga	tta	gcc	ttc		960
Met	Gly	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe		
305					310					315					320		
aaa	ccg	aat	acg	aac	gat	gtg	aga	tcc	gct	cca	gcg	ctt	gat	att	atc		1008
Lys	Pro	Asn	Thr	Asn	Asp	Val	Arg	Ser	Ala	Pro	Ala	Leu	Asp	Ile	Ile		
				325					330					335			
cca	atg	ctg	cag	cag	ctg	ggc	gcc	cat	gta	aaa	gca	tac	gat	ccg	att		1056
Pro	Met	Leu	Gln	Gln	Leu	Gly	Ala	His	Val	Lys	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile		
			340					345					350				
gct	att	cct	gaa	gct	tca	gcg	atc	ctt	ggc	gaa	cag	gtc	gag	tat	tac		1104
Ala	Ile	Pro	Glu	Ala	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	Glu	Tyr	Tyr		
		355					360					365					
aca	gat	gtg	tat	gct	gcg	atg	gaa	gac	act	gat	gca	tgc	ctg	att	tta		1152
Thr	Asp	Val	Tyr	Ala	Ala	Met	Glu	Asp	Thr	Asp	Ala	Cys	Leu	Ile	Leu		

370	375	380	
acg gat tgg ccg gaa gtg aaa gaa atg gag ctt gta aaa gtg aaa acc			1200
Thr Asp Trp Pro Glu Val Lys Glu Met Glu Leu Val Lys Val Lys Thr			
385	390	395	400
ctc tta aaa cag cca gtc atc att gac ggc aga aat tta ttt tca ctt			1248
Leu Leu Lys Gln Pro Val Ile Ile Asp Gly Arg Asn Leu Phe Ser Leu			
	405	410	415
gaa gag atg cag gca gcc gga tac att tat cac tct atc ggc cgt ccc			1296
Glu Glu Met Gln Ala Ala Gly Tyr Ile Tyr His Ser Ile Gly Arg Pro			
	420	425	430
gct gtt cgg gga acg gaa ccc tct gac aag tat ttt ccg ggc ttg ccg			1344
Ala Val Arg Gly Thr Glu Pro Ser Asp Lys Tyr Phe Pro Gly Leu Pro			
	435	440	445
ctt gaa gaa ttg gct aaa gac ttg gga agc gtc aat tta			1383
Leu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Leu Gly Ser Val Asn Leu			
	450	455	460

<210> 12

<211> 461

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 12

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

Lys Leu Val Gln Ser Ile Val Gln Lys Ala Ser Lys Gly Arg Tyr Ser
 130 135 140

Phe Asp Val Val Ser Asn Pro Glu Phe Leu Arg Glu Gly Ser Ala Ile
 145 150 155 160

His Asp Thr Met Asn Met Glu Arg Ala Val Ile Gly Ser Thr Ser His
 165 170 175

Lys Ala Ala Ala Ile Ile Glu Glu Leu His Gln Pro Phe His Ala Pro
 180 185 190

Val Ile Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala Glu Met Ile Lys Tyr Ala Ala
 195 200 205

Asn Ala Phe Leu Ala Thr Lys Ile Ser Phe Ile Asn Asp Ile Ala Asn
 210 215 220

Ile Cys Glu Arg Val Gly Ala Asp Val Ser Lys Val Ala Asp Gly Val
 225 230 235 240

Gly Leu Asp Ser Arg Ile Gly Arg Lys Phe Leu Lys Ala Gly Ile Gly
 245 250 255

Phe Gly Gly Ser Cys Phe Pro Lys Asp Thr Thr Ala Leu Leu Gln Ile
 260 265 270

Ala Lys Ser Ala Gly Tyr Pro Phe Lys Leu Ile Glu Ala Val Ile Glu
 275 280 285

Thr Asn Glu Lys Gln Arg Val His Ile Val Asp Lys Leu Leu Thr Val
 290 295 300

Met Gly Ser Val Lys Gly Arg Thr Ile Ser Val Leu Gly Leu Ala Phe
 305 310 315 320

Lys Pro Asn Thr Asn Asp Val Arg Ser Ala Pro Ala Leu Asp Ile Ile
 325 330 335

Pro Met Leu Gln Gln Leu Gly Ala His Val Lys Ala Tyr Asp Pro Ile
 340 345 350

Ala Ile Pro Glu Ala Ser Ala Ile Leu Gly Glu Gln Val Glu Tyr Tyr
 355 360 365

Thr Asp Val Tyr Ala Ala Met Glu Asp Thr Asp Ala Cys Leu Ile Leu
 370 375 380

Thr Asp Trp Pro Glu Val Lys Glu Met Glu Leu Val Lys Val Lys Thr
 385 390 395 400

Leu Leu Lys Gln Pro Val Ile Ile Asp Gly Arg Asn Leu Phe Ser Leu
 405 410 415

Glu Glu Met Gln Ala Ala Gly Tyr Ile Tyr His Ser Ile Gly Arg Pro
 420 425 430

Ala Val Arg Gly Thr Glu Pro Ser Asp Lys Tyr Phe Pro Gly Leu Pro
 435 440 445

Leu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Leu Gly Ser Val Asn Leu
 450 455 460

<210> 13

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 13

ggtaccgaca ctgacccat tataaa 26

10 <210> 14

<211> 49

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

15 <400> 14

gttaacgaat tccagctatg gcttcaacca de tatctagaca agtaacact 49

<210> 15

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 15

agcatcttaa cggctacaaa 20

25

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 5
 <400> 16
 tgtgagcgag tcggcgcaga 20

 <210> 17
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 17
 15 gggcgcccat gtaaaagcat 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Bacillus subtilis

 <400> 18
 ttgtagccg ttaagatgct 20

 25 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 30 <400> 19
 tctgcgccga ctcgctcaca 20

 <210> 20
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 20
 atgcttttac atggcgccc 20
 40
 <210> 21

<211> 876

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(876)

<223>

10 <400> 21

```

atg aaa aaa gta cgt aaa gcc ata att cca gca gca ggc tta gga aca      48
Met Lys Lys Val Arg Lys Ala Ile Ile Pro Ala Ala Gly Leu Gly Thr
1 .                    5                      10                      15

cgt ttt ctt ccg gct acg aaa gca atg ccg aaa gaa atg ctt cct atc      96
Arg Phe Leu Pro Ala Thr Lys Ala Met Pro Lys Glu Met Leu Pro Ile
                20                      25                      30

ggt gat aaa cct acc att caa tac ata att gaa gaa gct gtt gaa gcc      144
Val Asp Lys Pro Thr Ile Gln Tyr Ile Ile Glu Glu Ala Val Glu Ala
                35                      40                      45

ggt att gaa gat att att atc gta aca gga aaa agc aag cgt gcg att      192
Gly Ile Glu Asp Ile Ile Ile Val Thr Gly Lys Ser Lys Arg Ala Ile
                50                      55                      60

```

gag gat cat ttt gat tac tct cct gag ctt gaa aga aac cta gaa gaa Glu Asp His Phe Asp Tyr Ser Pro Glu Leu Glu Arg Asn Leu Glu Glu 65 70 75 80	240
aaa gga aaa act gag ctg ctt gaa aaa gtg aaa aag gct tct aac ctg Lys Gly Lys Thr Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys Lys Ala Ser Asn Leu 85 90 95	288
gct gac att cac tat atc cgc caa aaa gaa cct aaa ggt ctc gga cat Ala Asp Ile His Tyr Ile Arg Gln Lys Glu Pro Lys Gly Leu Gly His 100 105 110	336
gct gtc tgg tgc gca cgc aac ttt atc ggc gat gag ccg ttt gcg gta Ala Val Trp Cys Ala Arg Asn Phe Ile Gly Asp Glu Pro Phe Ala Val 115 120 125	384
ctg ctt ggt gac gat att gtt cag gct gaa act cca ggg ttg cgc caa Leu Leu Gly Asp Asp Ile Val Gln Ala Glu Thr Pro Gly Leu Arg Gln 130 135 140	432
tta atg gat gaa tat gaa aaa aca ctt tct tct att atc ggt gtt cag Leu Met Asp Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Ser Ser Ile Ile Gly Val Gln 145 150 155 160	480
cag gtg ccc gaa gaa gaa aca cac cgc tac ggc att att gac ccg ctg Gln Val Pro Glu Glu Glu Thr His Arg Tyr Gly Ile Ile Asp Pro Leu 165 170 175	528
aca agt gaa ggc cgc cgt tat cag gtg aaa aac ttc gtt gaa aaa ccg Thr Ser Glu Gly Arg Arg Tyr Gln Val Lys Asn Phe Val Glu Lys Pro 180 185 190	576
cct aaa ggc aca gca cct tct aat ctt gcc atc tta ggc cgt tac gta Pro Lys Gly Thr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ile Leu Gly Arg Tyr Val 195 200 205	624
ttc acg cct gag atc ttc atg tat tta gaa gag cag cag gtt ggc gcc Phe Thr Pro Glu Ile Phe Met Tyr Leu Glu Glu Gln Gln Val Gly Ala 210 215 220	672
ggc gga gaa att cag ctc aca gac gcc att caa aag ctg aat gaa att Gly Gly Glu Ile Gln Leu Thr Asp Ala Ile Gln Lys Leu Asn Glu Ile 225 230 235 240	720
caa aga gtg ttt gct tac gat ttt gaa ggc aag cgt tat gat gtt ggt Gln Arg Val Phe Ala Tyr Asp Phe Glu Gly Lys Arg Tyr Asp Val Gly 245 250 255	768
gaa aag ctc ggc ttt atc aca aca act ctt gaa ttt gcg atg cag gat Glu Lys Leu Gly Phe Ile Thr Thr Thr Leu Glu Phe Ala Met Gln Asp 260 265 270	816
aaa gag ctt cgc gat cag ctc gtt cca ttt atg gaa ggt tta cta aac Lys Glu Leu Arg Asp Gln Leu Val Pro Phe Met Glu Gly Leu Leu Asn 275 280 285	864
aaa gaa gaa atc Lys Glu Glu Ile 290	876

<210> 22

<211> 292

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

5

<400> 22

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

Arg Phe Leu Pro Ala Thr Lys Ala Met Pro Lys Glu Met Leu Pro Ile
 20 25 30

Val Asp Lys Pro Thr Ile Gln Tyr Ile Ile Glu Glu Ala Val Glu Ala
 35 40 45

Gly Ile Glu Asp Ile Ile Ile Val Thr Gly Lys Ser Lys Arg Ala Ile
 50 55 60

Glu Asp His Phe Asp Tyr Ser Pro Glu Leu Glu Arg Asn Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Lys Gly Lys Thr Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys Lys Ala Ser Asn Leu
 85 90 95

Ala Asp Ile His Tyr Ile Arg Gln Lys Glu Pro Lys Gly Leu Gly His
 100 105 110

Ala Val Trp Cys Ala Arg Asn Phe Ile Gly Asp Glu Pro Phe Ala Val
 115 120 125

Leu Leu Gly Asp Asp Ile Val Gln Ala Glu Thr Pro Gly Leu Arg Gln
 130 135 140

Leu Met Asp Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Ser Ser Ile Ile Gly Val Gln
 145 150 155 160

Gln Val Pro Glu Glu Glu Thr His Arg Tyr Gly Ile Ile Asp Pro Leu
 165 170 175

Thr Ser Glu Gly Arg Arg Tyr Gln Val Lys Asn Phe Val Glu Lys Pro
 180 185 190

Pro Lys Gly Thr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ile Leu Gly Arg Tyr Val
 195 200 205

Phe Thr Pro Glu Ile Phe Met Tyr Leu Glu Glu Gln Gln Val Gly Ala

210

215

220

Gly Gly Glu Ile Gln Leu Thr Asp Ala Ile Gln Lys Leu Asn Glu Ile
 225 230 235 240

Gln Arg Val Phe Ala Tyr Asp Phe Glu Gly Lys Arg Tyr Asp Val Gly
 245 250 255

Glu Lys Leu Gly Phe Ile Thr Thr Thr Leu Glu Phe Ala Met Gln Asp
 260 265 270

Lys Glu Leu Arg Asp Gln Leu Val Pro Phe Met Glu Gly Leu Leu Asn
 275 280 285

Lys Glu Glu Ile
 290

<210> 23

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 23

tctagatttt tcgatcataa ggaaggt 27

10 <210> 24

<211> 49

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

15 <400> 24

gtaacgaat tccagctatg taggatccaa tgtccaatag ccttttgt 49

<210> 25-

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 25

aaaaaggctt ctaacctggc 20

25

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 5
 <400> 26
 aaaccgccta aaggcacagc 20

 <210> 27
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 27
 15 gccaggtag aagcctttt 20

 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Bacillus subtilis

 <400> 28
 gctgtgcctt taggcggtt 20

 25 <210> 29
 <211> 1368
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1368)
 <223>

 35 <400> 29

atg gat aag cgg ttt gca gtt gtt tta gcg gct gga caa gga acg aga	48
Met Asp Lys Arg Phe Ala Val Val Leu Ala Ala Gly Gln Gly Thr Arg	
1 5 10 15	
atg aaa tcg aag ctt tat aaa gtc ctt cat cca gtt tgc ggt aag cct	96
Met Lys Ser Lys Leu Tyr Lys Val Leu His Pro Val Cys Gly Lys Pro	
20 25 30	
atg gta gag cac gtc gtg gac gaa gcc tta aaa tta tct tta tca aag	144
Met Val Glu His Val Val Asp Glu Ala Leu Lys Leu Ser Leu Ser Lys	
35 40 45	
ctt gtc acg att gtc gga cat ggt gcg gaa gaa gtg aaa aag cag ctt	192
Leu Val Thr Ile Val Gly His Gly Ala Glu Glu Val Lys Lys Gln Leu	
50 55 60	
ggt gat aaa agc gag tac gcg ctt caa gca aaa cag ctt ggc act gct	240
Gly Asp Lys Ser Glu Tyr Ala Leu Gln Ala Lys Gln Leu Gly Thr Ala	
65 70 75 80	
cat gct gta aaa cag gca cag cca ttt ctt gct gac gaa aaa ggc gtc	288
His Ala Val Lys Gln Ala Gln Pro Phe Leu Ala Asp Glu Lys Gly Val	
85 90 95	
aca att gtc att tgc gga gat acg ccg ctt ttg aca gca gag acg atg	336
Thr Ile Val Ile Cys Gly Asp Thr Pro Leu Leu Thr Ala Glu Thr Met	
100 105 110	
gaa cag atg ctg aaa gaa cat aca caa aga gaa gcg aaa gct acg att	384
Glu Gln Met Leu Lys Glu His Thr Gln Arg Glu Ala Lys Ala Thr Ile	
115 120 125	
tta act gcg gtt gca gaa gat cca act gga tac ggc cgc att att cgc	432
Leu Thr Ala Val Ala Glu Asp Pro Thr Gly Tyr Gly Arg Ile Ile Arg	

130	135	140	
agc gaa aac gga gcg gtt caa aaa ata gtt gag cat aag gac gcc tct			480
Ser Glu Asn Gly Ala Val Gln Lys Ile Val Glu His Lys Asp Ala Ser			
145	150	155	160
gaa gaa gaa cgt ctt gta act gag atc aac acc ggt acg tat tgt ttt			528
Glu Glu Glu Arg Leu Val Thr Glu Ile Asn Thr Gly Thr Tyr Cys Phe			
	165	170	175
gac aat gaa gcg cta ttt cgg gct att gat cag gtg tct aat gat aat			576
Asp Asn Glu Ala Leu Phe Arg Ala Ile Asp Gln Val Ser Asn Asp Asn			
	180	185	190
gca caa ggc gag tat tat ttg ccg gat gtc ata gag att ctt aaa aat			624
Ala Gln Gly Glu Tyr Tyr Leu Pro Asp Val Ile Glu Ile Leu Lys Asn			
	195	200	205
gaa ggc gaa act gtt gcc gct tac cag act ggt aat ttc caa gaa acg			672
Glu Gly Glu Thr Val Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Asn Phe Gln Glu Thr			
	210	215	220
ctc gga gtt aat gat aga gtt gct ctt tct cag gca gaa caa ttt atg			720
Leu Gly Val Asn Asp Arg Val Ala Leu Ser Gln Ala Glu Gln Phe Met			
	225	230	235
aaa gag cgc att aat aaa cgg cat atg caa aat ggc gtg acg ttg att			768
Lys Glu Arg Ile Asn Lys Arg His Met Gln Asn Gly Val Thr Leu Ile			
	245	250	255
gac ccg atg aat acg tat att tct cct gac gct gtt atc gga agc gat			816
Asp Pro Met Asn Thr Tyr Ile Ser Pro Asp Ala Val Ile Gly Ser Asp			
	260	265	270
act gtg att tac cct gga act gtg att aaa ggt gag gtg caa atc gga			864
Thr Val Ile Tyr Pro Gly Thr Val Ile Lys Gly Glu Val Gln Ile Gly			
	275	280	285
gaa gat acg att att ggc cct cat acg gag att atg aat agt gcc att			912
Glu Asp Thr Ile Ile Gly Pro His Thr Glu Ile Met Asn Ser Ala Ile			
	290	295	300
ggc agc cgt acg gtt att aaa caa tcg gta gtc aat cac agt aaa gtg			960
Gly Ser Arg Thr Val Ile Lys Gln Ser Val Val Asn His Ser Lys Val			
	305	310	315
ggg aat gat gta aac ata gga cct ttt gct cac atc aga cct gat tct			1008
Gly Asn Asp Val Asn Ile Gly Pro Phe Ala His Ile Arg Pro Asp Ser			
	325	330	335
gtc atc ggg aat gaa gtg aag atc ggg aat ttt gta gaa att aaa aag			1056
Val Ile Gly Asn Glu Val Lys Ile Gly Asn Phe Val Glu Ile Lys Lys			
	340	345	350
act caa ttc gga gac cga agc aag gca tct cat cta agc tat gtc ggc			1104
Thr Gln Phe Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser His Leu Ser Tyr Val Gly			
	355	360	365
gat gct gag gta ggc act gat gta aac ctg ggc tgc ggt tca att act			1152
Asp Ala Glu Val Gly Thr Asp Val Asn Leu Gly Cys Gly Ser Ile Thr			
	370	375	380

```

gtc aat tat gat gga aag aat aag tat ttg aca aaa att gaa gat ggc      1200
Val Asn Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Lys Ile Glu Asp Gly
385                               390.                          395                400

gcg ttt atc ggc tgc aat tcc aac ttg gtt gcc cct gtc aca gtc gga      1248
Ala Phe Ile Gly Cys Asn Ser Asn Leu Val Ala Pro Val Thr Val Gly
                              405                                410                         415

gaa ggc gct tat gtg gcg gca ggt tca act gtt acg gaa gat gta cct      1296
Glu Gly Ala Tyr Val Ala Ala Gly Ser Thr Val Thr Glu Asp Val Pro
                              420                                425                         430

gga aaa gca ctt gct att gcc aga gcg aga caa gta aat aaa gac gat      1344
Gly Lys Ala Leu Ala Ile Ala Arg Ala Arg Gln Val Asn Lys Asp Asp
                              435                                440                         445

tat gtg aaa aat att cat aaa aaa
Tyr Val Lys Asn Ile His Lys Lys
                              450                                455

```

<210> 30

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 30

Met Asp Lys Arg Phe Ala Val Val Leu Ala Ala Gly Gln Gly Thr Arg
 1 5 10 15

Met Lys Ser Lys Leu Tyr Lys Val Leu His Pro Val Cys Gly Lys Pro
 20 25 30

Met Val Glu His Val Val Asp Glu Ala Leu Lys Leu Ser Leu Ser Lys
 35 40 45

Leu Val Thr Ile Val Gly His Gly Ala Glu Glu Val Lys Lys Gln Leu
 50 55 60

Gly Asp Lys Ser Glu Tyr Ala Leu Gln Ala Lys Gln Leu Gly Thr Ala
 65 70 75 80

His Ala Val Lys Gln Ala Gln Pro Phe Leu Ala Asp Glu Lys Gly Val
 85 90 95

Thr Ile Val Ile Cys Gly Asp Thr Pro Leu Leu Thr Ala Glu Thr Met
 100 105 110

Glu Gln Met Leu Lys Glu His Thr Gln Arg Glu Ala Lys Ala Thr Ile
 115 120 125

Leu Thr Ala Val Ala Glu Asp Pro Thr Gly Tyr Gly Arg Ile Ile Arg
 130 135 140

Ser Glu Asn Gly Ala Val Gln Lys Ile Val Glu His Lys Asp Ala Ser
 145 150 155 160

Glu Glu Glu Arg Leu Val Thr Glu Ile Asn Thr Gly Thr Tyr Cys Phe
 165 170 175

Asp Asn Glu Ala Leu Phe Arg Ala Ile Asp Gln Val Ser Asn Asp Asn
 180 185 190

Ala Gln Gly Glu Tyr Tyr Leu Pro Asp Val Ile Glu Ile Leu Lys Asn
 195 200 205

Glu Gly Glu Thr Val Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Asn Phe Gln Glu Thr
 210 215 220

Leu Gly Val Asn Asp Arg Val Ala Leu Ser Gln Ala Glu Gln Phe Met
 225 230 235 240

Lys Glu Arg Ile Asn Lys Arg His Met Gln Asn Gly Val Thr Leu Ile
 245 250 255

Asp Pro Met Asn Thr Tyr Ile Ser Pro Asp Ala Val Ile Gly Ser Asp
 260 265 270

Thr Val Ile Tyr Pro Gly Thr Val Ile Lys Gly Glu Val Gln Ile Gly
 275 280 285

Glu Asp Thr Ile Ile Gly Pro His Thr Glu Ile Met Asn Ser Ala Ile
 290 295 300

Gly Ser Arg Thr Val Ile Lys Gln Ser Val Val Asn His Ser Lys Val
 305 310 315 320

Gly Asn Asp Val Asn Ile Gly Pro Phe Ala His Ile Arg Pro Asp Ser
 325 330 335

Val Ile Gly Asn Glu Val Lys Ile Gly Asn Phe Val Glu Ile Lys Lys
 340 345 350

Thr Gln Phe Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser His Leu Ser Tyr Val Gly
 355 360 365

Asp Ala Glu Val Gly Thr Asp Val Asn Leu Gly Cys Gly Ser Ile Thr

370

375

380

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

Ala Phe Ile Gly Cys Asn Ser Asn Leu Val Ala Pro Val Thr Val Gly
405 410 415

Glu Gly Ala Tyr Val Ala Ala Gly Ser Thr Val Thr Glu Asp Val Pro
420 425 430

Gly Lys Ala Leu Ala Ile Ala Arg Ala Arg Gln Val Asn Lys Asp Asp
435 440 445

Tyr Val Lys Asn Ile His Lys Lys
450 455

<210> 31

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 31

ggatccttc tatggataaa agggat 26

10 <210> 32

<211> 31

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

15 <400> 32

gtaacagga ttattttta tgaatattt t 31

<210> 33

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 33

cagagacgat ggaacagatg 20

	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 34	
	ggagttaatg atagagttgc	20
10	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
15	<400> 35	
	gaagatcggg aatttgtag	20
	<210> 36	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 36	
	catctgtcc atcgtctctg	20
25	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
30	<400> 37	
	gcaactctat cattaactcc	20
	<210> 38	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 38	
40	ctacaaaatt cccgatcttc	20

<210> 39

<211> 54

<212> ADN

<213> Streptococcus equisimilis

5

<400> 39

gtgtcggaac tgcttaagca de attcattaca cccgctgtcc ttctgttat ctcc 54

<210> 40

10 <211> 1203

<212> ADN

<213> Streptococcus equisimilis

<220>

15 <221> CDS

<222> (1).. (1203)

<223>

<400> 40

gtg	aaa	att	tct	gta	gca	ggc	tca	gga	tat	gtc	ggc	cta	tcc	ttg	agt	48
Val	Lys	Ile	Ser	Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	
1				5				10						15		

att	tta	ctg	gca	caa	cat	aat	gac	gtc	act	gtt	gtt	gat	att	att	gat	96
Ile	Leu	Leu	Ala	Gln	His	Asn	Asp	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Ile	Asp	
			20					25							30	

20

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

aga ggc att ccc cag tcc ttg atg tca gcg att gtt gag tcc aac aag	864
Arg Gly Ile Pro Gln Ser Leu Met Ser Ala Ile Val Glu Ser Asn Lys	
275 280 285	
ata cga aaa tcc tat tta gct gaa caa ata tta gac aga gcc tct agt	912
Ile Arg Lys Ser Tyr Leu Ala Glu Gln Ile Leu Asp Arg Ala Ser Ser	
290 295 300	
caa aag cag gct ggt gta cca tta acg att ggc ttt tac cgc ttg att	960
Gln Lys Gln Ala Gly Val Pro Leu Thr Ile Gly Phe Tyr Arg Leu Ile	
305 310 315 320	
atg aaa agc aac tct gat aat ttc cga gaa agc gcc att aaa gat att	1008
Met Lys Ser Asn Ser Asp Asn Phe Arg Glu Ser Ala Ile Lys Asp Ile	
325 330 335	
att gat atc atc aac gac tat ggg gtt aat att gtc att tac gaa ccc	1056
Ile Asp Ile Ile Asn Asp Tyr Gly Val Asn Ile Val Ile Tyr Glu Pro	
340 345 350	
atg ctt ggc gag gat att ggc tac agg gtt gtc aag gac tta gag cag	1104
Met Leu Gly Glu Asp Ile Gly Tyr Arg Val Val Lys Asp Leu Glu Gln	
355 360 365	
ttc aaa aac gag tct aca atc att gtg tca aat cgc ttt gag gac gac	1152
Phe Lys Asn Glu Ser Thr Ile Ile Val Ser Asn Arg Phe Glu Asp Asp	
370 375 380	
cta gga gat gtc att gat aag gtt tat acg aga gat gtc ttt gga aga	1200
Leu Gly Asp Val Ile Asp Lys Val Tyr Thr Arg Asp Val Phe Gly Arg	
385 390 395 400	
gac	1203
Asp	

<210> 41

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Streptococcus equisimilis

<400> 41

Val Lys Ile Ser Val Ala Gly Ser Gly Tyr Val Gly Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Ala Gln His Asn Asp Val Thr Val Val Asp Ile Ile Asp
 20 25 30

Glu Lys Val Arg Leu Ile Asn Gln Gly Ile Ser Pro Ile Lys Asp Ala
 35 40 45

Asp Ile Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ala Pro Leu Asn Leu Thr Ala Thr
 50 55 60

Leu Asp Gly Ala Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Asp Leu Ile Ile Ile Ala

65						70													75																			80	
Thr	Pro	Thr	Asn	Tyr	Asp	Ser	Glu	Arg	Asn	Tyr	Phe	Asp	Thr	Arg	His																								
				85					90					95																									
Val	Glu	Glu	Val	Ile	Glu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Asn	Ala	Ser	Ala	Thr																								
			100					105					110																										
Ile	Ile	Ile	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Leu	Gly	Phe	Ile	Lys	His	Val	Arg																								
			115				120					125																											
Glu	Lys	Tyr	Gln	Thr	Asp	Arg	Ile	Ile	Phe	Ser	Pro	Glu	Phe	Leu	Arg																								
	130					135					140																												
Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Tyr	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ser	Arg	Ile	Ile	Val																								
145					150					155																													
Ser	Tyr	Glu	Lys	Asp	Asp	Ser	Pro	Arg	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Lys	Ala																								
				165					170																														
Phe	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Lys	Ser	Lys	Asp	Thr	Pro	Val																								
			180					185																															
Leu	Phe	Met	Gly	Ser	Gln	Glu	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Leu	Phe	Ala	Asn																								
		195					200						205																										
Thr	Phe	Leu	Ala	Met	Arg	Val	Ser	Tyr	Phe	Asn	Glu	Leu	Asp	Thr	Tyr																								
	210					215					220																												
Ser	Glu	Ser	Lys	Gly	Leu	Asp	Ala	Gln	Arg	Val	Ile	Glu	Gly	Val	Cys																								
225					230				235						240																								
His	Asp	Gln	Arg	Ile	Gly	Asn	His	Tyr	Asn	Asn	Pro	Ser	Phe	Gly	Tyr																								
				245					250																														
Gly	Gly	Tyr	Cys	Leu	Pro	Lys	Asp	Ser	Lys	Gln	Leu	Leu	Ala	Asn	Tyr																								
			260					265																															
Arg	Gly	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Met	Ser	Ala	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Lys																								
		275					280																																
Ile	Arg	Lys	Ser	Tyr	Leu	Ala	Glu	Gln	Ile	Leu	Asp	Arg	Ala	Ser	Ser																								
	290					295					300																												
Gln	Lys	Gln	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Phe	Tyr	Arg	Leu	Ile																								
305					310						315																												

Met Lys Ser Asn Ser Asp Asn Phe Arg Glu Ser Ala Ile Lys Asp Ile
 325 330 335

Ile Asp Ile Ile Asn Asp Tyr Gly Val Asn Ile Val Ile Tyr Glu Pro
 340 345 350

Met Leu Gly Glu Asp Ile Gly Tyr Arg Val Val Lys Asp Leu Glu Gln
 355 360 365

Phe Lys Asn Glu Ser Thr Ile Ile Val Ser Asn Arg Phe Glu Asp Asp
 370 375 380

Leu Gly Asp Val Ile Asp Lys Val Tyr Thr Arg Asp Val Phe Gly Arg
 385 390 395 400

Asp

<210> 42

<211> 900

<212> ADN

5 <213> Streptococcus equisimilis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

10 <223>

<400> 42

atg	aca	aag	gtc	aga	aaa	gcc	att	atc	cca	gcc	gcc	ggc	cta	ggc	act	48
Met	Thr	Lys	Val	Arg	Lys	Ala	Ile	Ile	Pro	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Thr	
1				5					10					15		
cgc	ttc	cta	ccc	gcc	acc	aag	gca	ctg	gcc	aag	gaa	atg	ctc	cca	atc	96
Arg	Phe	Leu	Pro	Ala	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Glu	Met	Leu	Pro	Ile	
			20					25						30		
gtc	gat	aag	cca	acc	att	caa	ttc	atc	gtc	gag	gaa	gct	cta	aag	gcc	144
Val	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Gln	Phe	Ile	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Ala	
		35					40					45				
ggt	atc	gag	gag	att	ctt	gtc	gtc	acc	ggc	aag	gcc	aaa	cgc	tct	att	192
Gly	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Lys	Ala	Lys	Arg	Ser	Ile	
	50					55					60					
gaa	gac	cac	ttt	gac	tcc	aac	ttc	gag	ctc	gaa	tac	aat	ctc	caa	gcc	240
Glu	Asp	His	Phe	Asp	Ser	Asn	Phe	Glu	Leu	Glu	Tyr	Asn	Leu	Gln	Ala	
65					70					75					80	
aag	ggc	aaa	acc	gag	ctg	ctc	aag	ctc	gtt	gat	gag	acc	act	gcc	atc	288
Lys	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Thr	Thr	Ala	Ile	
				85					90					95		

aac ctg cac ttc att cgt cag agc cac cct aga gga cta ggg gac gct	336
Asn Leu His Phe Ile Arg Gln Ser His Pro Arg Gly Leu Gly Asp Ala	
100 105 110	
gtc ctc cag gcc aag gcc ttt gtg ggc aat gag ccc ttt gtg gtc atg	384
Val Leu Gln Ala Lys Ala Phe Val Gly Asn Glu Pro Phe Val Val Met	
115 120 125	
ctg ggg gat gac ctc atg gat att acc aat cct agt gcc aag ccc ttg	432
Leu Gly Asp Asp Leu Met Asp Ile Thr Asn Pro Ser Ala Lys Pro Leu	
130 135 140	
gcc aag cag ctc att gag gat tat gat tgc aca cac gcc tca acg att	480
Ala Lys Gln Leu Ile Glu Asp Tyr Asp Cys Thr His Ala Ser Thr Ile	
145 150 155 160	
gca gtg atg agg gtg ccg cat gag gag gtt tcc aat tat ggc gtg att	528
Ala Val Met Arg Val Pro His Glu Glu Val Ser Asn Tyr Gly Val Ile	
165 170 175	
gca ccg caa ggg aag gct gtt aag ggc ttg tat agt gtg gag acc ttt	576
Ala Pro Gln Gly Lys Ala Val Lys Gly Leu Tyr Ser Val Glu Thr Phe	
180 185 190	
gtt gag aag cca agt cca gat gag gca ccg agt gac tta gcg att att	624
Val Glu Lys Pro Ser Pro Asp Glu Ala Pro Ser Asp Leu Ala Ile Ile	
195 200 205	
ggt cga tat ttg ttg acg cct gag att ttt gcc ata ttg gag aat cag	672
Gly Arg Tyr Leu Leu Thr Pro Glu Ile Phe Ala Ile Leu Glu Asn Gln	
210 215 220	
gcg cct ggg gct ggc aat gag gta cag cta gcc gat gcg att gac aag	720
Ala Pro Gly Ala Gly Asn Glu Val Gln Leu Ala Asp Ala Ile Asp Lys	
225 230 235 240	
ctc aac aag act cag cgg gtt ttt gcg agg gag ttt aag gga gag cgg	768
Leu Asn Lys Thr Gln Arg Val Phe Ala Arg Glu Phe Lys Gly Glu Arg	
245 250 255	
tat gat gtt ggg gac aag ttt ggc ttt atg aag acc tca ctt gac tat	816
Tyr Asp Val Gly Asp Lys Phe Gly Phe Met Lys Thr Ser Leu Asp Tyr	
260 265 270	
gct ctc aag cac cct cag gtc aag gac gac ctc act gac tac att ata	864
Ala Leu Lys His Pro Gln Val Lys Asp Asp Leu Thr Asp Tyr Ile Ile	
275 280 285	
aag ctc agt aag caa ctg aac aag gac gtt aaa aaa	900
Lys Leu Ser Lys Gln Leu Asn Lys Asp Val Lys Lys	
290 295 300	

<211> 300

<212> PRT

<213> Streptococcus equisimilis

5 <400> 43

Met Thr Lys Val Arg Lys Ala Ile Ile Pro Ala Ala Gly Leu Gly Thr

1	5	10	15
Arg Phe Leu Pro Ala Thr Lys Ala Leu Ala Lys Glu Met Leu Pro Ile	20	25	30
Val Asp Lys Pro Thr Ile Gln Phe Ile Val Glu Glu Ala Leu Lys Ala	35	40	45
Gly Ile Glu Glu Ile Leu Val Val Thr Gly Lys Ala Lys Arg Ser Ile	50	55	60
Glu Asp His Phe Asp Ser Asn Phe Glu Leu Glu Tyr Asn Leu Gln Ala	65	70	75
Lys Gly Lys Thr Glu Leu Leu Lys Leu Val Asp Glu Thr Thr Ala Ile	85	90	95
Asn Leu His Phe Ile Arg Gln Ser His Pro Arg Gly Leu Gly Asp Ala	100	105	110
Val Leu Gln Ala Lys Ala Phe Val Gly Asn Glu Pro Phe Val Val Met	115	120	125
Leu Gly Asp Asp Leu Met Asp Ile Thr Asn Pro Ser Ala Lys Pro Leu	130	135	140
Ala Lys Gln Leu Ile Glu Asp Tyr Asp Cys Thr His Ala Ser Thr Ile	145	150	155
Ala Val Met Arg Val Pro His Glu Glu Val Ser Asn Tyr Gly Val Ile	165	170	175
Ala Pro Gln Gly Lys Ala Val Lys Gly Leu Tyr Ser Val Glu Thr Phe	180	185	190
Val Glu Lys Pro Ser Pro Asp Glu Ala Pro Ser Asp Leu Ala Ile Ile	195	200	205
Gly Arg Tyr Leu Leu Thr Pro Glu Ile Phe Ala Ile Leu Glu Asn Gln	210	215	220
Ala Pro Gly Ala Gly Asn Glu Val Gln Leu Ala Asp Ala Ile Asp Lys	225	230	235
Leu Asn Lys Thr Gln Arg Val Phe Ala Arg Glu Phe Lys Gly Glu Arg	245	250	255

Tyr Asp Val Gly Asp Lys Phe Gly Phe Met Lys Thr Ser Leu Asp Tyr
 260 265 270

Ala Leu Lys His Pro Gln Val Lys Asp Asp Leu Thr Asp Tyr Ile Ile
 275 280 285

Lys Leu Ser Lys Gln Leu Asn Lys Asp Val Lys Lys
 290 295 300

<210> 44

<211> 1380

<212> ADN

5 <213> Streptococcus equisimilis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

10 <223>

<400> 44

atg	aaa	aac	tac	gcc	att	atc	cta	gca	gct	gga	aag	gga	acc	cgc	atg	48
Met	Lys	Asn	Tyr	Ala	Ile	Ile	Leu	Ala	Ala	Gly	Lys	Gly	Thr	Arg	Met	
1				5				10						15		
aat	tca	ggg	ctt	tcc	aag	gtg	ctg	cac	aag	gta	tca	ggc	cta	agc	atg	96
Asn	Ser	Gly	Leu	Ser	Lys	Val	Leu	His	Lys	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Met	
			20					25						30		
ctg	gag	cat	gtc	ctc	aag	agc	gtc	tca	gcc	cta	gct	cct	caa	aag	caa	144
Leu	Glu	His	Val	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Pro	Gln	Lys	Gln	
		35					40					45				
ctc	aca	gtg	atc	ggc	cat	cag	gca	gag	caa	gta	cgt	gcc	gtc	cta	ggc	192
Leu	Thr	Val	Ile	Gly	His	Gln	Ala	Glu	Gln	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Gly	
	50					55					60					
gat	caa	tta	ctg	aca	gtg	gtg	caa	gag	gag	cag	cta	gga	aca	ggc	cat	240
Asp	Gln	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Gln	Glu	Glu	Gln	Leu	Gly	Thr	Gly	His	
65					70					75					80	
gca	gtc	atg	atg	gca	gaa	gag	gag	cta	tct	ggc	tta	gaa	ggg	cag	acc	288
Ala	Val	Met	Met	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly	Gln	Thr	
				85					90					95		
cta	gtg	att	gca	ggc	gac	acc	ccc	ttg	atc	aga	gga	gaa	agc	ctc	aag	336
Leu	Val	Ile	Ala	Gly	Asp	Thr	Pro	Leu	Ile	Arg	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	
			100					105					110			
gct	ctg	cta	gac	tat	cat	atc	aga	gaa	aag	aat	gtg	gca	acc	att	ctc	384
Ala	Leu	Leu	Asp	Tyr	His	Ile	Arg	Glu	Lys	Asn	Val	Ala	Thr	Ile	Leu	
		115					120					125				
aca	gcc	aat	gcc	aag	gat	ccc	ttt	ggc	tac	ggc	cga	atc	att	cgc	aat	432
Thr	Ala	Asn	Ala	Lys	Asp	Pro	Phe	Gly	Tyr	Gly	Arg	Ile	Ile	Arg	Asn	
	130					135					140					

gca gca gga gag gtg gtc aac atc gtt gaa caa aag gac gct aat gag 480
Ala Ala Gly Glu Val Val Asn Ile Val Glu Gln Lys Asp Ala Asn Glu
145 150 155 160

gca gag caa gag gtc aag gag atc aac aca ggg acc tat atc ttt gac 528
Ala Glu Gln Glu Val Lys Glu Ile Asn Thr Gly Thr Tyr Ile Phe Asp
165 170 175

aat aag cgc ctc ttt gag gct cta aag cat ctc acg act gat aat gcc 576
Asn Lys Arg Leu Phe Glu Ala Leu Lys His Leu Thr Thr Asp Asn Ala
180 185 190

caa ggg gaa tat tac cta acc gat gtg atc agt att ttc aag gcc agc 624
Gln Gly Glu Tyr Tyr Leu Thr Asp Val Ile Ser Ile Phe Lys Ala Ser
195 200 205

caa gaa aag gtt gga gct tac ctg ctg aag gat ttt gat gaa agc cta 672
Gln Glu Lys Val Gly Ala Tyr Leu Leu Lys Asp Phe Asp Glu Ser Leu
210 215 220

ggg gtt aat gat cgc cta gct cta gcc cag gct gag gtg atc atg cag 720
Gly Val Asn Asp Arg Leu Ala Leu Ala Gln Ala Glu Val Ile Met Gln
225 230 235 240

gag cgg atc aac aag cag cac atg ctt aat ggg gtg acc ctg caa aac 768
Glu Arg Ile Asn Lys Gln His Met Leu Asn Gly Val Thr Leu Gln Asn
245 250 255

cct gca gct acc tat atc gaa agc agt gta gag att gcg ccg gac gtc 816
Pro Ala Ala Thr Tyr Ile Glu Ser Ser Val Glu Ile Ala Pro Asp Val
260 265 270

ttg att gaa gct aat gtg acc cta aag gga cag act aga att ggc agc 864
Leu Ile Glu Ala Asn Val Thr Leu Lys Gly Gln Thr Arg Ile Gly Ser
275 280 285

aga agt gtt ata acc aat ggg agc tat atc ctt gat tca agg ctt ggt 912
Arg Ser Val Ile Thr Asn Gly Ser Tyr Ile Leu Asp Ser Arg Leu Gly
290 295 300

gag ggc gta gtg gtg agc cag tca gtg att gag ggc tca gtc cta gca 960
Glu Gly Val Val Val Ser Gln Ser Val Ile Glu Gly Ser Val Leu Ala
305 310 315 320

gat ggt gtg aca gta ggg ccc tat gca cac att cgc ccg gac tct cag 1008
Asp Gly Val Thr Val Gly Pro Tyr Ala His Ile Arg Pro Asp Ser Gln
325 330 335

ctc gat gag tgt gtt cat att ggg aac ttt gta gag gtt aag ggg tct 1056
Leu Asp Glu Cys Val His Ile Gly Asn Phe Val Glu Val Lys Gly Ser
340 345 350

cat cta ggg gcc aat acc aag gca ggg cat ttg act tat ctg ggg aat 1104
His Leu Gly Ala Asn Thr Lys Ala Gly His Leu Thr Tyr Leu Gly Asn
355 360 365

gcc gag att ggc tca gag gtt aat att ggt gca gga agc att acg gtt 1152
Ala Glu Ile Gly Ser Glu Val Asn Ile Gly Ala Gly Ser Ile Thr Val
370 375 380

aat tat gat ggt caa cgg aaa tac cag aca gtg att ggc gat cac gct 1200

Asn	Tyr	Asp	Gly	Gln	Arg	Lys	Tyr	Gln	Thr	Val	Ile	Gly	Asp	His	Ala	
385					390					395					400	
ttt	att	ggg	agt	cat	tcg	act	ttg	ata	gct	ccg	gta	gag	ggt	ggg	gag	1248
Phe	Ile	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Leu	Ile	Ala	Pro	Val	Glu	Val	Gly	Glu	
				405					410					415		
aat	gct	tta	aca	gca	gca	ggg	tct	acg	ata	gcc	cag	tcg	gtg	cca	gca	1296
Asn	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Ile	Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Ala	
			420					425					430			
gac	agt	gtg	gct	ata	ggg	cgt	agc	cgt	cag	gtg	gtg	aag	gaa	ggc	tat	1344
Asp	Ser	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Ser	Arg	Gln	Val	Val	Lys	Glu	Gly	Tyr	
		435					440					445				
gcc	aag	agg	cta	cca	cat	cac	ccg	gat	cag	ccc	cag					1380
Ala	Lys	Arg	Leu	Pro	His	His	Pro	Asp	Gln	Pro	Gln					
	450					455					460					

<210> 45

<211> 460

<212> PRT

5 <213> Streptococcus equisimilis

<400> 45

Met Lys Asn Tyr Ala Ile Ile Leu Ala Ala Gly Lys Gly Thr Arg Met
 1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ser Lys Val Leu His Lys Val Ser Gly Leu Ser Met
 20 25 30

Leu Glu His Val Leu Lys Ser Val Ser Ala Leu Ala Pro Gln Lys Gln
 35 40 45

Leu Thr Val Ile Gly His Gln Ala Glu Gln Val Arg Ala Val Leu Gly
 50 55 60

Asp Gln Leu Leu Thr Val Val Gln Glu Glu Gln Leu Gly Thr Gly His
 65 70 75 80

Ala Val Met Met Ala Glu Glu Glu Leu Ser Gly Leu Glu Gly Gln Thr
 85 90 95

Leu Val Ile Ala Gly Asp Thr Pro Leu Ile Arg Gly Glu Ser Leu Lys
 100 105 110

Ala Leu Leu Asp Tyr His Ile Arg Glu Lys Asn Val Ala Thr Ile Leu
 115 120 125

Thr Ala Asn Ala Lys Asp Pro Phe Gly Tyr Gly Arg Ile Ile Arg Asn
 130 135 140

Ala Ala Gly Glu Val Val Asn Ile Val Glu Gln Lys Asp Ala Asn Glu
 145 150 155 160

Ala Glu Gln Glu Val Lys Glu Ile Asn Thr Gly Thr Tyr Ile Phe Asp
 165 170 175

Asn Lys Arg Leu Phe Glu Ala Leu Lys His Leu Thr Thr Asp Asn Ala
 180 185 190

Gln Gly Glu Tyr Tyr Leu Thr Asp Val Ile Ser Ile Phe Lys Ala Ser
 195 200 205

Gln Glu Lys Val Gly Ala Tyr Leu Leu Lys Asp Phe Asp Glu Ser Leu
 210 215 220

Gly Val Asn Asp Arg Leu Ala Leu Ala Gln Ala Glu Val Ile Met Gln
 225 230 235 240

Glu Arg Ile Asn Lys Gln His Met Leu Asn Gly Val Thr Leu Gln Asn
 245 250 255

Pro Ala Ala Thr Tyr Ile Glu Ser Ser Val Glu Ile Ala Pro Asp Val
 260 265 270

Leu Ile Glu Ala Asn Val Thr Leu Lys Gly Gln Thr Arg Ile Gly Ser
 275 280 285

Arg Ser Val Ile Thr Asn Gly Ser Tyr Ile Leu Asp Ser Arg Leu Gly
 290 295 300

Glu Gly Val Val Val Ser Gln Ser Val Ile Glu Gly Ser Val Leu Ala
 305 310 315 320

Asp Gly Val Thr Val Gly Pro Tyr Ala His Ile Arg Pro Asp Ser Gln
 325 330 335

Leu Asp Glu Cys Val His Ile Gly Asn Phe Val Glu Val Lys Gly Ser
 340 345 350

His Leu Gly Ala Asn Thr Lys Ala Gly His Leu Thr Tyr Leu Gly Asn
 355 360 365

Ala Glu Ile Gly Ser Glu Val Asn Ile Gly Ala Gly Ser Ile Thr Val
 370 375 380

Asn Tyr Asp Gly Gln Arg Lys Tyr Gln Thr Val Ile Gly Asp His Ala
 385 390 395 400

Phe Ile Gly Ser His Ser Thr Leu Ile Ala Pro Val Glu Val Gly Glu
 405 410 415

Asn Ala Leu Thr Ala Ala Gly Ser Thr Ile Ala Gln Ser Val Pro Ala
 420 425 430

Asp Ser Val Ala Ile Gly Arg Ser Arg Gln Val Val Lys Glu Gly Tyr
 435 440 445

Ala Lys Arg Leu Pro His His Pro Asp Gln Pro Gln
 450 455 460

<210> 46

<211> 29

<212> ADN

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 46

gcggccgcgg tacctgtgtt acacctgtt 29

10 <210> 47

<211> 38

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

15 <400> 47

gtcaagctta attctcatgt ttgacagctt atcatcgg 38

<210> 48

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 48

catgggagag acctttgg 18

25

<210> 49

<211> 17

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

 <400> 49
 gtcggtcttc cattgc 17
 5
 <210> 50
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 10
 <400> 50
 cgaccactgt atcttg 17

 <210> 51
 15 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 51
 20 gagatgcca acagtgc 17

 <210> 52
 <211> 16
 <212> ADN
 25 <213> Bacillus subtilis

 <400> 52
 catgtccatc gtgacg 16

 30 <210> 53
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 35 <400> 53
 caggagcatt tgatcg 17

 <210> 54
 <211> 16
 40 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

	<400> 54 ccttcagatg tgatcc	16
5	<210> 55 <211> 17 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
10	<400> 55 gtgtgacgt caactgc	17
15	<210> 56 <211> 18 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
20	<400> 56 gttcagcctt tcctctcg	18
25	<210> 57 <211> 18 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
30	<400> 57 gctaccttct ttcttagg	18
35	<210> 58 <211> 18 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
40	<400> 58 cgccaatag atctgtgc	18
	<210> 59 <211> 17 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	

	<400> 59	
	ggaaagaagg tctgtgc	17
5	<210> 60 <211> 17 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
10	<400> 60 cagctatcag ctgacag	17
15	<210> 61 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
20	<400> 61 gctcagctat gacatatcc	20
25	<210> 62 <211> 17 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
30	<400> 62 gatcgtcttg attaccg	17
35	<210> 63 <211> 16 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
40	<400> 63 agctttatcg gtgacg	16
	<210> 64 <211> 16 <212> ADN <213> Bacillus subtilis	
	<400> 64	

	tgagcacgat tgcagg	16
	<210> 65	
	<211> 17	
5	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 65	
	cattgcggag acattgc	17
10	<210> 66	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
15	<400> 66	
	tagacaattg gaagagaaaa gagata	26
	<210> 67	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 67	
25	ccgtcgctat tgtaaccagt	20
	<210> 68	
	<211> 29	
	<212> ADN	
30	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 68	
	ggaattccaa agctgcagcg gccggcgcg	29
35	<210> 69	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
40	<400> 69	
	gaagatctcg tatacttggc ttctgcagct gc	32

<210> 70
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Bacillus subtilis

 <400> 70
 gaagatctgg tcaacaagct ggaaagcact c 31

 10 <210> 71
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 15 <400> 71
 cccaagcttc gtgacgtaca gcaccgttc ggc 33

 <210> 72
 <211> 50
 20 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 72
 ccttaagggc cgaatatta tacggagctc cctgaaaca caaaaacggc 50
 25
 <210> 73
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 30
 <400> 73
 ggtgttctct agagcggccg cggttgcggt cagc 34

 <210> 74
 35 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 74
 40 gtcttcttg gtacctggaa gcagagc 27

<210> 75
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 5
 <400> 75
 gtataaatat tcggccctta aggccagtac cattttccc 39

 <210> 76
 10 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 76
 15 gggccggatc cgc 13

 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Bacillus subtilis

 <400> 77
 attcccggcc taggcgccgg 20

 25 <210> 78
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 30 <400> 78
 ggaaattatc gtgatcaac 19

 <210> 79
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 79
 gcacgagcac tgataaatat g 21
 40
 <210> 80

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

5 <400> 80
 catattatc agtgctcgtg c 21

<210> 81
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

<400> 81
 tcgtagacct catatgc 17
 15

<210> 82
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 20

<400> 82
 gtcgtaaac cgtgtgc 17

<210> 83
 25 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

<400> 83
 30 ctagaggatc cccgggtacc gtgctctgcc ttttagtcc 39

<210> 84
 <211> 37
 <212> ADN
 35 <213> Bacillus subtilis

<400> 84
 gtacatcgaa ttcgtgctca ttattaatct gttcagc 37

40 <210> 85
 <211> 20

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 85

5 aactattgcc gatgataagc 20

<210> 86

<211> 1260

<212> ADN

10 <213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1260)

15 <223>

<400> 86

atg	aaa	aaa	gtg	atg	tta	gct	acg	gct	ttg	ttt	tta	gga	ttg	act	cca	48
Met	Lys	Lys	Val	Met	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Pro	
1				5					10					15		
gct	ggc	gcg	aac	gca	gct	gat	tta	ggc	cac	cag	acg	ttg	gga	tcc	aat	96
Ala	Gly	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gln	Thr	Leu	Gly	Ser	Asn	
			20					25						30		
gat	ggc	tgg	ggc	gcg	tac	tcg	acc	ggc	acg	aca	ggc	gga	tca	aaa	gca	144
Asp	Gly	Trp	Gly	Ala	Tyr	Ser	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Ser	Lys	Ala	
		35					40					45				
tcc	tcc	tca	aat	gtg	tat	acc	gtc	agc	aac	aga	aac	cag	ctt	gtc	tcg	192
Ser	Ser	Ser	Asn	Val	Tyr	Thr	Val	Ser	Asn	Arg	Asn	Gln	Leu	Val	Ser	
	50					55					60					
gca	tta	ggg	aag	gaa	acg	aac	aca	acg	cca	aaa	atc	att	tat	atc	aag	240
Ala	Leu	Gly	Lys	Glu	Thr	Asn	Thr	Thr	Pro	Lys	Ile	Ile	Tyr	Ile	Lys	
65					70					75					80	
gga	acg	att	gac	atg	aac	gtg	gat	gac	aat	ctg	aag	ccg	ctt	ggc	cta	288
Gly	Thr	Ile	Asp	Met	Asn	Val	Asp	Asp	Asn	Leu	Lys	Pro	Leu	Gly	Leu	
				85					90					95		
aat	gac	tat	aaa	gat	ccg	gag	tat	gat	ttg	gac	aaa	tat	ttg	aaa	gcc	336
Asn	Asp	Tyr	Lys	Asp	Pro	Glu	Tyr	Asp	Leu	Asp	Lys	Tyr	Leu	Lys	Ala	
			100					105						110		
tat	gat	cct	agc	aca	tgg	ggc	aaa	aaa	gag	ccg	tcg	gga	aca	caa	gaa	384
Tyr	Asp	Pro	Ser	Thr	Trp	Gly	Lys	Lys	Glu	Pro	Ser	Gly	Thr	Gln	Glu	
		115					120					125				
gaa	gcg	aga	gca	cgc	tct	cag	aaa	aac	caa	aaa	gca	cgg	gtc	atg	gtg	432
Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Gln	Lys	Asn	Gln	Lys	Ala	Arg	Val	Met	Val	
	130					135					140					

gat atc cct gca aac acg acg atc gtc ggt tca ggg act aac gct aaa Asp Ile Pro Ala Asn Thr Thr Ile Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys 145 150 155 160	480
gtc gtg gga gga aac ttc caa atc aag agt gat aac gtc att att cgc Val Val Gly Gly Asn Phe Gln Ile Lys Ser Asp Asn Val Ile Ile Arg 165 170 175	528
aac att gaa ttc cag gat gcc tat gac tat ttt ccg caa tgg gat ccg Asn Ile Glu Phe Gln Asp Ala Tyr Asp Tyr Phe Pro Gln Trp Asp Pro 180 185 190	576
act gac gga agc tca ggg aac tgg aac tca caa tac gac aac atc acg Thr Asp Gly Ser Ser Gly Asn Trp Asn Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Thr 195 200 205	624
ata aac ggc ggc aca cac atc tgg att gat cac tgt aca ttt aat gac Ile Asn Gly Gly Thr His Ile Trp Ile Asp His Cys Thr Phe Asn Asp 210 215 220	672
ggg tcg cgt ccg gac agc aca tca ccg aaa tat tat gga aga aaa tat Gly Ser Arg Pro Asp Ser Thr Ser Pro Lys Tyr Tyr Gly Arg Lys Tyr 225 230 235 240	720
cag cac cat gac ggc caa acg gat gct tcc aac ggt gct aac tat atc Gln His His Asp Gly Gln Thr Asp Ala Ser Asn Gly Ala Asn Tyr Ile 245 250 255	768
acg atg tcc tac aac tat tat cac gat cat gat aaa agc tcc att ttc Thr Met Ser Tyr Asn Tyr Tyr His Asp His Asp Lys Ser Ser Ile Phe 260 265 270	816
gga tca agt gac agc aaa acc tcc gat gac ggc aaa tta aaa att acg Gly Ser Ser Asp Ser Lys Thr Ser Asp Asp Gly Lys Leu Lys Ile Thr 275 280 285	864
ctg cat cat aac cgc tat aaa aat att gtc cag cgc gcg ccg aga gtc Leu His His Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Val Gln Arg Ala Pro Arg Val 290 295 300	912
cgc ttc ggg caa gtg cac gta tac aac aac tat tat gaa gga agc aca Arg Phe Gly Gln Val His Val Tyr Asn Asn Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr 305 310 315 320	960
agc tct tca agt tat cct ttt agc tat gca tgg gga atc gga aag tca Ser Ser Ser Ser Tyr Pro Phe Ser Tyr Ala Trp Gly Ile Gly Lys Ser 325 330 335	1008
tct aaa atc tat gcc caa aac aat gtc att gac gta ccg gga ctg tca Ser Lys Ile Tyr Ala Gln Asn Asn Val Ile Asp Val Pro Gly Leu Ser 340 345 350	1056
gct gct aaa acg atc agc gta ttc agc ggg gga acg gct tta tat gac Ala Ala Lys Thr Ile Ser Val Phe Ser Gly Gly Thr Ala Leu Tyr Asp 355 360 365	1104
tcc ggc acg ttg ctg aac ggc aca cag atc aac gca tcg gct gca aac Ser Gly Thr Leu Leu Asn Gly Thr Gln Ile Asn Ala Ser Ala Ala Asn 370 375 380	1152

ggg ctg agc tct tct gtc ggc tgg acg ccg tct ctg cat gga tcg att 1200
 Gly Leu Ser Ser Ser Val Gly Trp Thr Pro Ser Leu His Gly Ser Ile
 385 390 395 400

gat gct tct gct aat gtg aaa tca aat gtt ata aat caa gcg ggt gcg 1248
 Asp Ala Ser Ala Asn Val Lys Ser Asn Val Ile Asn Gln Ala Gly Ala
 405 410 415

ggt aaa tta aat 1260
 Gly Lys Leu Asn
 420

<210> 87

<211> 420

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 87

Met Lys Lys Val Met Leu Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Leu Thr Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Asn Ala Ala Asp Leu Gly His Gln Thr Leu Gly Ser Asn
 20 25 30

Asp Gly Trp Gly Ala Tyr Ser Thr Gly Thr Thr Gly Gly Ser Lys Ala
 35 40 45

Ser Ser Ser Asn Val Tyr Thr Val Ser Asn Arg Asn Gln Leu Val Ser
 50 55 60

Ala Leu Gly Lys Glu Thr Asn Thr Thr Pro Lys Ile Ile Tyr Ile Lys
 65 70 75 80

Gly Thr Ile Asp Met Asn Val Asp Asp Asn Leu Lys Pro Leu Gly Leu
 85 90 95

Asn Asp Tyr Lys Asp Pro Glu Tyr Asp Leu Asp Lys Tyr Leu Lys Ala
 100 105 110

Tyr Asp Pro Ser Thr Trp Gly Lys Lys Glu Pro Ser Gly Thr Gln Glu
 115 120 125

Glu Ala Arg Ala Arg Ser Gln Lys Asn Gln Lys Ala Arg Val Met Val
 130 135 140

Asp Ile Pro Ala Asn Thr Thr Ile Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys
 145 150 155 160

Val Val Gly Gly Asn Phe Gln Ile Lys Ser Asp Asn Val Ile Ile Arg

				165						170										175
Asn	Ile	Glu	Phe	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Gln	Trp	Asp	Pro					
			180					185					190							
Thr	Asp	Gly	Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Asp	Asn	Ile	Thr					
		195					200					205								
Ile	Asn	Gly	Gly	Thr	His	Ile	Trp	Ile	Asp	His	Cys	Thr	Phe	Asn	Asp					
	210					215					220									
Gly	Ser	Arg	Pro	Asp	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Lys	Tyr					
225					230					235					240					
Gln	His	His	Asp	Gly	Gln	Thr	Asp	Ala	Ser	Asn	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ile					
				245					250					255						
Thr	Met	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	His	Asp	His	Asp	Lys	Ser	Ser	Ile	Phe					
			260					265						270						
Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Lys	Thr	Ser	Asp	Asp	Gly	Lys	Leu	Lys	Ile	Thr					
		275					280					285								
Leu	His	His	Asn	Arg	Tyr	Lys	Asn	Ile	Val	Gln	Arg	Ala	Pro	Arg	Val					
	290					295					300									
Arg	Phe	Gly	Gln	Val	His	Val	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Ser	Thr					
305					310					315					320					
Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Phe	Ser	Tyr	Ala	Trp	Gly	Ile	Gly	Lys	Ser					
				325					330					335						
Ser	Lys	Ile	Tyr	Ala	Gln	Asn	Asn	Val	Ile	Asp	Val	Pro	Gly	Leu	Ser					
			340					345					350							
Ala	Ala	Lys	Thr	Ile	Ser	Val	Phe	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Leu	Tyr	Asp					
		355					360					365								
Ser	Gly	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Asn					
	370					375					380									
Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Trp	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Gly	Ser	Ile					
385					390					395					400					
Asp	Ala	Ser	Ala	Asn	Val	Lys	Ser	Asn	Val	Ile	Asn	Gln	Ala	Gly	Ala					
				405					410					415						

Gly Lys Leu Asn
420

<210> 88
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Bacillus subtilis

 <400> 88
 actagtaatg atggctgggg cgcgta 26

 10 <210> 89
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 15 <400> 89
 gtcgacatgt tgcgtattg tgagtt 26

 <210> 90
 <211> 52
 20 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 90
 gagctctaca acgcttatgg atccgcggcc gcggcggcac acacatctgg at 52
 25
 <210> 91
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
 30
 <400> 91
 gacgtcagcc cgtttgcagc cgatgc 26

 <210> 92
 35 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Streptococcus pyogenes

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1257)

<223>

5

<400> 92

gtg	cct	att	ttt	aaa	aaa	act	tta	att	gtt	tta	tcc	ttt	att	ttt	ttg	48
Val	Pro	Ile	Phe	Lys	Lys	Thr	Leu	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Ile	Phe	Leu	
1				5					10					15		
ata	tct	atc	ttg	att	tat	cta	aat	atg	tat	cta	ttt	gga	aca	tca	act	96
Ile	Ser	Ile	Leu	Ile	Tyr	Leu	Asn	Met	Tyr	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Thr	
			20					25						30		

gta gga att tat gga gta ata tta ata acc tat cta gtt att aaa ctt Val Gly Ile Tyr Gly Val Ile Leu Ile Thr Tyr Leu Val Ile Lys Leu 35 40 45	144
gga tta tct ttc ctt tat gag cca ttt aaa gga aag cca cat gac tat Gly Leu Ser Phe Leu Tyr Glu Pro Phe Lys Gly Lys Pro His Asp Tyr 50 55 60	192
aaa gtt gct gct gta att cct tct tat aat gaa gat gcc gag tca tta Lys Val Ala Ala Val Ile Pro Ser Tyr Asn Glu Asp Ala Glu Ser Leu 65 70 75 80	240
tta gaa act ctt aaa agt gtg tta gca cag acc tat ccg tta tca gaa Leu Glu Thr Leu Lys Ser Val Leu Ala Gln Thr Tyr Pro Leu Ser Glu 85 90 95	288
att tat att gtt gat gat ggg agt tca aac aca gat gca ata caa tta Ile Tyr Ile Val Asp Asp Gly Ser Ser Asn Thr Asp Ala Ile Gln Leu 100 105 110	336
att gaa gag tat gta aat aga gaa gtg gat att tgt cga aac gtt atc Ile Glu Glu Tyr Val Asn Arg Glu Val Asp Ile Cys Arg Asn Val Ile 115 120 125	384
gtt cac cgt tcc ctt gtc aat aaa gga aaa cgc cat gct caa gcg tgg Val His Arg Ser Leu Val Asn Lys Gly Lys Arg His Ala Gln Ala Trp 130 135 140	432
gca ttt gaa aga tct gac gct gac gtt ttt tta acc gta gat tca gat Ala Phe Glu Arg Ser Asp Ala Asp Val Phe Leu Thr Val Asp Ser Asp 145 150 155 160	480
act tat atc tat cca aat gcc tta gaa gaa ctc cta aaa agc ttc aat Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ala Leu Glu Glu Leu Leu Lys Ser Phe Asn 165 170 175	528
gat gag aca gtt tat gct gca aca gga cat ttg aat gct aga aac aga Asp Glu Thr Val Tyr Ala Ala Thr Gly His Leu Asn Ala Arg Asn Arg 180 185 190	576
caa act aat cta tta acg cga ctt aca gat atc cgt tac gat aat gcc Gln Thr Asn Leu Leu Thr Arg Leu Thr Asp Ile Arg Tyr Asp Asn Ala 195 200 205	624
ttt ggg gtg gag cgt gct gct caa tca tta aca ggt aat att tta gtt Phe Gly Val Glu Arg Ala Ala Gln Ser Leu Thr Gly Asn Ile Leu Val 210 215 220	672
tgc tca gga cca ttg agt att tat cga cgt gaa gtg att att cct aac Cys Ser Gly Pro Leu Ser Ile Tyr Arg Arg Glu Val Ile Ile Pro Asn 225 230 235 240	720
tta gag cgc tat aaa aat caa aca ttc cta ggt tta cct gtt agc att Leu Glu Arg Tyr Lys Asn Gln Thr Phe Leu Gly Leu Pro Val Ser Ile 245 250 255	768
ggg gat gat cga tgt tta aca aat tat gct att gat tta gga cgc act Gly Asp Asp Arg Cys Leu Thr Asn Tyr Ala Ile Asp Leu Gly Arg Thr 260 265 270	816
gtc tac caa tca aca gct aga tgt gat act gat gta cct ttc caa tta	864

Val	Tyr	Gln	Ser	Thr	Ala	Arg	Cys	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Phe	Gln	Leu	
		275					280					285				
aaa	agt	tat	tta	aag	caa	caa	aat	cga	tgg	aat	aaa	tct	ttt	ttt	aaa	912
Lys	Ser	Tyr	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Arg	Trp	Asn	Lys	Ser	Phe	Phe	Lys	
	290					295					300					
gaa	tct	att	att	tct	gtt	aaa	aaa	att	ctt	tct	aat	ccc	atc	gtt	gcc	960
Glu	Ser	Ile	Ile	Ser	Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Ser	Asn	Pro	Ile	Val	Ala	
305					310					315					320	
tta	tgg	act	att	ttc	gaa	gtc	gtt	atg	ttt	atg	atg	ttg	att	gtc	gca	1008
Leu	Trp	Thr	Ile	Phe	Glu	Val	Val	Met	Phe	Met	Met	Leu	Ile	Val	Ala	
				325					330					335		
att	ggg	aat	ctt	ttg	ttt	aat	caa	gct	att	caa	tta	gac	ctt	att	aaa	1056
Ile	Gly	Asn	Leu	Leu	Phe	Asn	Gln	Ala	Ile	Gln	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	
			340					345					350			
ctt	ttt	gcc	ttt	tta	tcc	atc	atc	ttt	atc	gtt	gct	tta	tgt	cgt	aat	1104
Leu	Phe	Ala	Phe	Leu	Ser	Ile	Ile	Phe	Ile	Val	Ala	Leu	Cys	Arg	Asn	
		355					360					365				
gtt	cat	tat	atg	atc	aaa	cat	cct	gct	agt	ttt	ttg	tta	tct	cct	ctg	1152
Val	His	Tyr	Met	Ile	Lys	His	Pro	Ala	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Pro	Leu	
	370					375					380					
tat	gga	ata	tta	cac	ttg	ttt	gtc	tta	cag	ccc	cta	aaa	ctt	tat	tct	1200
Tyr	Gly	Ile	Leu	His	Leu	Phe	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	Tyr	Ser	
385					390					395					400	
tta	tgc	acc	att	aaa	aat	acg	gaa	tgg	gga	aca	cgt	aaa	aag	gtc	act	1248
Leu	Cys	Thr	Ile	Lys	Asn	Thr	Glu	Trp	Gly	Thr	Arg	Lys	Lys	Val	Thr	
				405					410					415		
att	ttt	aaa														1257
Ile	Phe	Lys														

<210> 93

<211> 419

<212> PRT

5 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 93

Val Pro Ile Phe Lys Lys Thr Leu Ile Val Leu Ser Phe Ile Phe Leu
 1 5 10 15

Ile Ser Ile Leu Ile Tyr Leu Asn Met Tyr Leu Phe Gly Thr Ser Thr
 20 25 30

Val Gly Ile Tyr Gly Val Ile Leu Ile Thr Tyr Leu Val Ile Lys Leu
 35 40 45

Gly Leu Ser Phe Leu Tyr Glu Pro Phe Lys Gly Lys Pro His Asp Tyr
 50 55 60

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

Glu Ser Ile Ile Ser Val Lys Lys Ile Leu Ser Asn Pro Ile Val Ala
 305 310 315 320

Leu Trp Thr Ile Phe Glu Val Val Met Phe Met Met Leu Ile Val Ala
 325 330 335

Ile Gly Asn Leu Leu Phe Asn Gln Ala Ile Gln Leu Asp Leu Ile Lys
 340 345 350

Leu Phe Ala Phe Leu Ser Ile Ile Phe Ile Val Ala Leu Cys Arg Asn
 355 360 365

Val His Tyr Met Ile Lys His Pro Ala Ser Phe Leu Leu Ser Pro Leu
 370 375 380

Tyr Gly Ile Leu His Leu Phe Val Leu Gln Pro Leu Lys Leu Tyr Ser
 385 390 395 400

Leu Cys Thr Ile Lys Asn Thr Glu Trp Gly Thr Arg Lys Lys Val Thr
 405 410 415

Ile Phe Lys

<210> 94

<211> 2916

<212> ADN

5 <213> Pasteurella multocida

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2916)

10 <223>

<400> 94

Val	Asn	Val	Cys	Asp	Ser	Pro	Leu	Asp	Ile	Ala	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	
65					70					75					80	
tcc	aac	gta	aaa	aaa	tta	gta	ctt	tct	gac	tcg	gaa	aaa	aac	acg	tta	288
Ser	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Lys	Asn	Thr	Leu	
			85						90					95		
aaa	aat	aaa	tgg	aaa	ttg	ctc	act	gag	aag	aaa	tct	gaa	aat	gcg	gag	336
Lys	Asn	Lys	Trp	Lys	Leu	Leu	Thr	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu	Asn	Ala	Glu	
			100					105						110		
gta	aga	gcg	gtc	gcc	ctt	gta	cca	aaa	gat	ttt	ccc	aaa	gat	ctg	gtt	384
Val	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Val	Pro	Lys	Asp	Phe	Pro	Lys	Asp	Leu	Val	
			115					120						125		
tta	gcg	cct	tta	cct	gat	cat	gtt	aat	gat	ttt	aca	tgg	tac	aaa	aag	432
Leu	Ala	Pro	Leu	Pro	Asp	His	Val	Asn	Asp	Phe	Thr	Trp	Tyr	Lys	Lys	
			130				135					140				
cga	aag	aaa	aga	ctt	ggc	ata	aaa	cct	gaa	cat	caa	cat	ggt	ggt	ctt	480
Arg	Lys	Lys	Arg	Leu	Gly	Ile	Lys	Pro	Glu	His	Gln	His	Val	Gly	Leu	
					150					155					160	
tct	att	atc	ggt	aca	aca	ttc	aat	cga	cca	gca	att	tta	tcg	att	aca	528
Ser	Ile	Ile	Val	Thr	Thr	Phe	Asn	Arg	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ile	Thr	
				165						170					175	
tta	gcc	tgt	tta	gta	aac	caa	aaa	aca	cat	tac	ccg	ttt	gaa	ggt	atc	576
Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Asn	Gln	Lys	Thr	His	Tyr	Pro	Phe	Glu	Val	Ile	
			180					185						190		
gtg	aca	gat	gat	ggg	agt	cag	gaa	gat	cta	tca	ccg	atc	att	cgc	caa	624
Val	Thr	Asp	Asp	Gly	Ser	Gln	Glu	Asp	Leu	Ser	Pro	Ile	Ile	Arg	Gln	
				195				200						205		
tat	gaa	aat	aaa	ttg	gat	att	cgc	tac	gtc	aga	caa	aaa	gat	aac	ggg	672
Tyr	Glu	Asn	Lys	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Val	Arg	Gln	Lys	Asp	Asn	Gly	
							215						220			
ttt	caa	gcc	agt	gcc	gct	cgg	aat	atg	gga	tta	cgc	tta	gca	aaa	tat	720
Phe	Gln	Ala	Ser	Ala	Ala	Arg	Asn	Met	Gly	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Tyr	
					230						235				240	
gac	ttt	att	ggc	tta	ctc	gac	tgt	gat	atg	gcg	cca	aat	cca	tta	tgg	768
Asp	Phe	Ile	Gly	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Met	Ala	Pro	Asn	Pro	Leu	Trp	
				245					250						255	
ggt	cat	tct	tat	ggt	gca	gag	cta	tta	gaa	gat	gat	gat	tta	aca	atc	816
Val	His	Ser	Tyr	Val	Ala	Glu	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Ile	
				260					265						270	
att	ggg	cca	aga	aaa	tac	atc	gat	aca	caa	cat	att	gac	cca	aaa	gac	864
Ile	Gly	Pro	Arg	Lys	Tyr	Ile	Asp	Thr	Gln	His	Ile	Asp	Pro	Lys	Asp	
				275				280					285			
ttc	tta	aat	aac	gcg	agt	ttg	ctt	gaa	tca	tta	cca	gaa	gtg	aaa	acc	912
Phe	Leu	Asn	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Glu	Val	Lys	Thr	
							295					300				
aat	aat	agt	ggt	gcc	gca	aaa	ggg	gaa	gga	aca	ggt	tct	ctg	gat	tgg	960
Asn	Asn	Ser	Val	Ala	Ala	Lys	Gly	Glu	Gly	Thr	Val	Ser	Leu	Asp	Trp	

305		310		315		320	
cgc tta gaa caa ttc gaa aaa aca gaa aat ctc cgc tta tcc gat tcg							1008
Arg Leu Glu Gln Phe Glu Lys Thr Glu Asn Leu Arg Leu Ser Asp Ser							
		325		330		335	
cct ttc cgt ttt ttt gcg gcg ggt aat gtt gct ttc gct aaa aaa tgg							1056
Pro Phe Arg Phe Phe Ala Ala Gly Asn Val Ala Phe Ala Lys Lys Trp							
		340		345		350	
cta aat aaa tcc ggt ttc ttt gat gag gaa ttt aat cac tgg ggt gga							1104
Leu Asn Lys Ser Gly Phe Phe Asp Glu Glu Phe Asn His Trp Gly Gly							
		355		360		365	
gaa gat gtg gaa ttt gga tat cgc tta ttc cgt tac ggt agt ttc ttt							1152
Glu Asp Val Glu Phe Gly Tyr Arg Leu Phe Arg Tyr Gly Ser Phe Phe							
		370		375		380	
aaa act att gat ggc att atg gcc tac cat caa gag cca cca ggt aaa							1200
Lys Thr Ile Asp Gly Ile Met Ala Tyr His Gln Glu Pro Pro Gly Lys							
		385		390		395	400
gaa aat gaa acc gat cgt gaa gcg gga aaa aat att acg ctc gat att							1248
Glu Asn Glu Thr Asp Arg Glu Ala Gly Lys Asn Ile Thr Leu Asp Ile							
		405		410		415	
atg aga gaa aag gtc cct tat atc tat aga aaa ctt tta cca ata gaa							1296
Met Arg Glu Lys Val Pro Tyr Ile Tyr Arg Lys Leu Leu Pro Ile Glu							
		420		425		430	
gat tcg cat atc aat aga gta cct tta gtt tca att tat atc cca gct							1344
Asp Ser His Ile Asn Arg Val Pro Leu Val Ser Ile Tyr Ile Pro Ala							
		435		440		445	
tat aac tgt gca aac tat att caa cgt tgc gta gat aqt qca ctg aat							1392
Tyr Asn Cys Ala Asn Tyr Ile Gln Arg Cys Val Asp Ser Ala Leu Asn							
		450		455		460	
cag act gtt gtt gat ctc gag gtt tgt att tgt aac gat ggt tca aca							1440
Gln Thr Val Val Asp Leu Glu Val Cys Ile Cys Asn Asp Gly Ser Thr							
		465		470		475	480
gat aat acc tta gaa gtg atc aat aag ctt tat ggt aat aat cct agg							1488
Asp Asn Thr Leu Glu Val Ile Asn Lys Leu Tyr Gly Asn Asn Pro Arg							
		485		490		495	
gta cgc atc atg tct aaa cca aat ggc gga ata gcc tca gca tca aat							1536
Val Arg Ile Met Ser Lys Pro Asn Gly Gly Ile Ala Ser Ala Ser Asn							
		500		505		510	
gca gcc gtt tct ttt gct aaa ggt tat tac att ggg cag tta gat tca							1584
Ala Ala Val Ser Phe Ala Lys Gly Tyr Tyr Ile Gly Gln Leu Asp Ser							
		515		520		525	
gat gat tat ctt gag cct gat gca gtt gaa ctg tgt tta aaa gaa ttt							1632
Asp Asp Tyr Leu Glu Pro Asp Ala Val Glu Leu Cys Leu Lys Glu Phe							
		530		535		540	
tta aaa gat aaa acg cta gct tgt gtt tat acc act aat aga aac gtc							1680
Leu Lys Asp Lys Thr Leu Ala Cys Val Tyr Thr Thr Asn Arg Asn Val							
		545		550		555	560

aat ccg gat ggt agc tta atc gct aat ggt tac aat tgg cca gaa ttt	1728
Asn Pro Asp Gly Ser Leu Ile Ala Asn Gly Tyr Asn Trp Pro Glu Phe	
565 570 575	
tca cga gaa aaa ctc aca acg gct atg att gct cac cac ttt aga atg	1776
Ser Arg Glu Lys Leu Thr Thr Ala Met Ile Ala His His Phe Arg Met	
580 585 590	
ttc acg att aga gct tgg cat tta act gat gga ttc aat gaa aaa att	1824
Phe Thr Ile Arg Ala Trp His Leu Thr Asp Gly Phe Asn Glu Lys Ile	
595 600 605	
gaa aat gcc gta gac tat gac atg ttc ctc aaa ctc agt gaa gtt gga	1872
Glu Asn Ala Val Asp Tyr Asp Met Phe Leu Lys Leu Ser Glu Val Gly	
610 615 620	
aaa ttt aaa cat ctt aat aaa atc tgc tat aac cgt gta tta cat ggt	1920
Lys Phe Lys His Leu Asn Lys Ile Cys Tyr Asn Arg Val Leu His Gly	
625 630 635 640	
gat aac aca tca att aag aaa ctt ggc att caa aag aaa aac cat ttt	1968
Asp Asn Thr Ser Ile Lys Lys Leu Gly Ile Gln Lys Lys Asn His Phe	
645 650 655	
gtt gta gtc aat cag tca tta aat aga caa ggc ata act tat tat aat	2016
Val Val Val Asn Gln Ser Leu Asn Arg Gln Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn	
660 665 670	
tat gac gaa ttt gat gat tta gat gaa agt aga aag tat att ttc aat	2064
Tyr Asp Glu Phe Asp Asp Leu Asp Glu Ser Arg Lys Tyr Ile Phe Asn	
675 680 685	
aaa acc gct gaa tat caa gaa gag att gat atc tta aaa gat att aaa	2112
Lys Thr Ala Glu Tyr Gln Glu Glu Ile Asp Ile Leu Lys Asp Ile Lys	
690 695 700	
atc atc cag aat aaa gat gcc aaa atc gca gtc agt att ttt tat ccc	2160
Ile Ile Gln Asn Lys Asp Ala Lys Ile Ala Val Ser Ile Phe Tyr Pro	
705 710 715 720	
aat aca tta aac ggc tta gtg aaa aaa cta aac aat att att gaa tat	2208
Asn Thr Leu Asn Gly Leu Val Lys Lys Leu Asn Asn Ile Ile Glu Tyr	
725 730 735	
aat aaa aat ata ttc gtt att gtt cta cat gtt gat aag aat cat ctt	2256
Asn Lys Asn Ile Phe Val Ile Val Leu His Val Asp Lys Asn His Leu	
740 745 750	
aca cca gat atc aaa aaa gaa ata cta gcc ttc tat cat aaa cat caa	2304
Thr Pro Asp Ile Lys Lys Glu Ile Leu Ala Phe Tyr His Lys His Gln	
755 760 765	
gtg aat att tta cta aat aat gat atc tca tat tac acg agt aat aga	2352
Val Asn Ile Leu Leu Asn Asn Asp Ile Ser Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg	
770 775 780	
tta ata aaa act gag gcg cat tta agt aat att aat aaa tta agt cag	2400
Leu Ile Lys Thr Glu Ala His Leu Ser Asn Ile Asn Lys Leu Ser Gln	
785 790 795 800	

tta aat cta aat tgt gaa tac atc att ttt gat aat cat gac agc cta	2448
Leu Asn Leu Asn Cys Glu Tyr Ile Ile Phe Asp Asn His Asp Ser Leu	
805 810 815	
ttc gtt aaa aat gac agc tat gct tat atg aaa aaa tat gat gtc ggc	2496
Phe Val Lys Asn Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Lys Lys Tyr Asp Val Gly	
820 825 830	
atg aat ttc tca gca tta aca cat gat tgg atc gag aaa atc aat gcg	2544
Met Asn Phe Ser Ala Leu Thr His Asp Trp Ile Glu Lys Ile Asn Ala	
835 840 845	
cat cca cca ttt aaa aag ctc att aaa act tat ttt aat gac aat gac	2592
His Pro Pro Phe Lys Lys Leu Ile Lys Thr Tyr Phe Asn Asp Asn Asp	
850 855 860	
tta aaa agt atg aat gtg aaa ggg gca tca caa ggt atg ttt atg acg	2640
Leu Lys Ser Met Asn Val Lys Gly Ala Ser Gln Gly Met Phe Met Thr	
865 870 875 880	
tat gcg cta gcg cat gag ctt ctg acg att att aaa gaa gtc atc aca	2688
Tyr Ala Leu Ala His Glu Leu Leu Thr Ile Ile Lys Glu Val Ile Thr	
885 890 895	
tct tgc cag tca att gat agt gtg cca gaa tat aac act gag gat att	2736
Ser Cys Gln Ser Ile Asp Ser Val Pro Glu Tyr Asn Thr Glu Asp Ile	
900 905 910	
tgg ttc caa ttt gca ctt tta atc tta gaa aag aaa acc ggc cat gta	2784
Trp Phe Gln Phe Ala Leu Leu Ile Leu Glu Lys Lys Thr Gly His Val	
915 920 925	
ttt aat aaa aca tcg acc ctg act tat atg cct tgg gaa cga aaa tta	2832
Phe Asn Lys Thr Ser Thr Leu Thr Tyr Met Pro Trp Glu Arg Lys Leu	
930 935 940	
caa tgg aca aat gaa caa att gaa agt gca aaa aga gga gaa aat ata	2880
Gln Trp Thr Asn Glu Gln Ile Glu Ser Ala Lys Arg Gly Glu Asn Ile	
945 950 955 960	
cct gtt aac aag ttc att att aat agt ata act cta	2916
Pro Val Asn Lys Phe Ile Ile Asn Ser Ile Thr Leu	
965 970	

<210> 95

<211> 972

<212> PRT

5 <213> Pasteurella multocida

<400> 95

Met Asn Thr Leu Ser Gln Ala Ile Lys Ala Tyr Asn Ser Asn Asp Tyr
1 5 10 15

Gln Leu Ala Leu Lys Leu Phe Glu Lys Ser Ala Glu Ile Tyr Gly Arg
20 25 30

Lys Ile Val Glu Phe Gln Ile Thr Lys Cys Gln Glu Lys Leu Ser Ala

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

Phe Leu Asn Asn Ala Ser Leu Leu Glu Ser Leu Pro Glu Val Lys Thr
 290 295 300

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

Arg Leu Glu Gln Phe Glu Lys Thr Glu Asn Leu Arg Leu Ser Asp Ser
 325 330 335

Pro Phe Arg Phe Phe Ala Ala Gly Asn Val Ala Phe Ala Lys Lys Trp
 340 345 350

Leu Asn Lys Ser Gly Phe Phe Asp Glu Glu Phe Asn His Trp Gly Gly
 355 360 365

Glu Asp Val Glu Phe Gly Tyr Arg Leu Phe Arg Tyr Gly Ser Phe Phe
 370 375 380

Lys Thr Ile Asp Gly Ile Met Ala Tyr His Gln Glu Pro Pro Gly Lys
 385 390 395 400

Glu Asn Glu Thr Asp Arg Glu Ala Gly Lys Asn Ile Thr Leu Asp Ile
 405 410 415

Met Arg Glu Lys Val Pro Tyr Ile Tyr Arg Lys Leu Leu Pro Ile Glu
 420 425 430

Asp Ser His Ile Asn Arg Val Pro Leu Val Ser Ile Tyr Ile Pro Ala
 435 440 445

Tyr Asn Cys Ala Asn Tyr Ile Gln Arg Cys Val Asp Ser Ala Leu Asn
 450 455 460

Gln Thr Val Val Asp Leu Glu Val Cys Ile Cys Asn Asp Gly Ser Thr
 465 470 475 480

Asp Asn Thr Leu Glu Val Ile Asn Lys Leu Tyr Gly Asn Asn Pro Arg
 485 490 495

Val Arg Ile Met Ser Lys Pro Asn Gly Gly Ile Ala Ser Ala Ser Asn
 500 505 510

Ala Ala Val Ser Phe Ala Lys Gly Tyr Tyr Ile Gly Gln Leu Asp Ser
 515 520 525

Asp Asp Tyr Leu Glu Pro Asp Ala Val Glu Leu Cys Leu Lys Glu Phe
 530 535 540

Leu Lys Asp Lys Thr Leu Ala Cys Val Tyr Thr Thr Asn Arg Asn Val
 545 550 555 560

Asn Pro Asp Gly Ser Leu Ile Ala Asn Gly Tyr Asn Trp Pro Glu Phe
 565 570 575

Ser Arg Glu Lys Leu Thr Thr Ala Met Ile Ala His His Phe Arg Met
 580 585 590

Phe Thr Ile Arg Ala Trp His Leu Thr Asp Gly Phe Asn Glu Lys Ile
 595 600 605

Glu Asn Ala Val Asp Tyr Asp Met Phe Leu Lys Leu Ser Glu Val Gly
 610 615 620

Lys Phe Lys His Leu Asn Lys Ile Cys Tyr Asn Arg Val Leu His Gly
 625 630 635 640

Asp Asn Thr Ser Ile Lys Lys Leu Gly Ile Gln Lys Lys Asn His Phe
 645 650 655

Val Val Val Asn Gln Ser Leu Asn Arg Gln Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn
 660 665 670

Tyr Asp Glu Phe Asp Asp Leu Asp Glu Ser Arg Lys Tyr Ile Phe Asn
 675 680 685

Lys Thr Ala Glu Tyr Gln Glu Glu Ile Asp Ile Leu Lys Asp Ile Lys
 690 695 700

Ile Ile Gln Asn Lys Asp Ala Lys Ile Ala Val Ser Ile Phe Tyr Pro
 705 710 715 720

Asn Thr Leu Asn Gly Leu Val Lys Lys Leu Asn Asn Ile Ile Glu Tyr
 725 730 735

Asn Lys Asn Ile Phe Val Ile Val Leu His Val Asp Lys Asn His Leu
 740 745 750

Thr Pro Asp Ile Lys Lys Glu Ile Leu Ala Phe Tyr His Lys His Gln
 755 760 765

Val Asn Ile Leu Leu Asn Asn Asp Ile Ser Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg
770 775 780

Leu Ile Lys Thr Glu Ala His Leu Ser Asn Ile Asn Lys Leu Ser Gln
785 790 795 800

Leu Asn Leu Asn Cys Glu Tyr Ile Ile Phe Asp Asn His Asp Ser Leu
805 810 815

Phe Val Lys Asn Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Lys Lys Tyr Asp Val Gly
820 825 830

Met Asn Phe Ser Ala Leu Thr His Asp Trp Ile Glu Lys Ile Asn Ala
835 840 845

His Pro Pro Phe Lys Lys Leu Ile Lys Thr Tyr Phe Asn Asp Asn Asp
850 855 860

Leu Lys Ser Met Asn Val Lys Gly Ala Ser Gln Gly Met Phe Met Thr
865 870 875 880

Tyr Ala Leu Ala His Glu Leu Leu Thr Ile Ile Lys Glu Val Ile Thr
885 890 895

Ser Cys Gln Ser Ile Asp Ser Val Pro Glu Tyr Asn Thr Glu Asp Ile
900 905 910

Trp Phe Gln Phe Ala Leu Leu Ile Leu Glu Lys Lys Thr Gly His Val
915 920 925

Phe Asn Lys Thr Ser Thr Leu Thr Tyr Met Pro Trp Glu Arg Lys Leu
930 935 940

Gln Trp Thr Asn Glu Gln Ile Glu Ser Ala Lys Arg Gly Glu Asn Ile
945 950 955 960

Pro Val Asn Lys Phe Ile Ile Asn Ser Ile Thr Leu
965 970

<210> 96

<211> 1206

<212> ADN

<213> Streptococcus pyogenes

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(1206)

<223>

<400> 96

atg	aaa	ata	gca	ggt	gct	gga	tca	gga	tat	ggt	gga	tta	tca	cta	gga	48
Met	Lys	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	
1			5						10					15		
ggt	ctt	tta	tca	ctt	caa	aac	gaa	gtc	act	att	ggt	gat	att	ctt	ccc	96
Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Gln	Asn	Glu	Val	Thr	Ile	Val	Asp	Ile	Leu	Pro	
			20					25						30		
tct	aaa	ggt	gat	aag	att	aat	aat	ggc	tta	tca	cca	att	caa	gat	gaa	144
Ser	Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Asn	Asn	Gly	Leu	Ser	Pro	Ile	Gln	Asp	Glu	
		35					40						45			
tat	att	gaa	tat	tac	tta	aaa	agt	aag	caa	tta	tct	att	aaa	gca	act	192
Tyr	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Gln	Leu	Ser	Ile	Lys	Ala	Thr	
		50				55						60				
tta	gat	agc	aaa	gca	gct	tat	aaa	gaa	gcg	gaa	ctg	gtc	att	att	gcc	240
Leu	Asp	Ser	Lys	Ala	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Ile	Ala	
65					70					75					80	
aca	cct	aca	aat	tac	aac	agt	aga	att	aat	tat	ttt	gat	aca	cag	cat	288
Thr	Pro	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Arg	Ile	Asn	Tyr	Phe	Asp	Thr	Gln	His	
				85					90					95		
ggt	gaa	aca	ggt	atc	aaa	gag	gta	cta	agc	ggt	aat	agc	cat	gca	act	336
Val	Glu	Thr	Val	Ile	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	Val	Asn	Ser	His	Ala	Thr	
			100					105						110		
ctt	atc	atc	aaa	tca	aca	att	cca	ata	ggg	ttc	att	act	gaa	atg	aga	384
Leu	Ile	Ile	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ile	Gly	Phe	Ile	Thr	Glu	Met	Arg	
			115				120						125			
cag	aaa	ttc	caa	act	gat	cgt	att	atc	ttc	agc	cct	gaa	ttt	tta	aga	432
Gln	Lys	Phe	Gln	Thr	Asp	Arg	Ile	Ile	Phe	Ser	Pro	Glu	Phe	Leu	Arg	
		130				135						140				
gaa	tct	aaa	gct	tta	tat	gac	aac	tta	tat	cca	agc	cga	att	att	ggt	480
Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Tyr	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ser	Arg	Ile	Ile	Val	
145					150					155					160	
tct	tgt	gaa	gaa	aac	gat	tct	cca	aaa	gta	aag	gca	gac	gca	gaa	aaa	528
Ser	Cys	Glu	Glu	Asn	Asp	Ser	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Ala	Glu	Lys	
				165					170					175		
ttt	gca	ctt	tta	tta	aag	tct	gca	gct	aaa	aaa	aat	aat	gta	cca	gta	576
Phe	Ala	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Ala	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Val	Pro	Val	
			180						185					190		
ctt	att	atg	gga	gct	tca	gaa	gct	gaa	gca	gta	aaa	cta	ttt	gcc	aat	624
Leu	Ile	Met	Gly	Ala	Ser	Glu	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Leu	Phe	Ala	Asn	
			195					200						205		
act	tat	tta	gcg	tta	agg	gta	gct	tat	ttt	aat	gag	tta	gac	act	tac	672
Thr	Tyr	Leu	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Tyr	Phe	Asn	Glu	Leu	Asp	Thr	Tyr	
		210				215					220					
gca	gaa	tcg	aga	aaa	tta	aat	agt	cac	atg	att	att	caa	gga	att	tct	720
Ala	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Ser	His	Met	Ile	Ile	Gln	Gly	Ile	Ser	
225					230						235				240	

tat gat gat cga ata gga atg cat tat aat aac cca tca ttt ggt tat	768
Tyr Asp Asp Arg Ile Gly Met His Tyr Asn Asn Pro Ser Phe Gly Tyr	
245 250 255	
gga ggt tat tgt cta cct aaa gat acg aag caa tta ttg gca aat tac	816
Gly Gly Tyr Cys Leu Pro Lys Asp Thr Lys Gln Leu Leu Ala Asn Tyr	
260 265 270	
aat aat att cct caa acg cta att gaa gct atc gtt tca tca aat aat	864
Asn Asn Ile Pro Gln Thr Leu Ile Glu Ala Ile Val Ser Ser Asn Asn	
275 280 285	
gtg cgc aag tcc tat att gct aag caa att atc aac gtc tta gaa gag	912
Val Arg Lys Ser Tyr Ile Ala Lys Gln Ile Ile Asn Val Leu Glu Glu	
290 295 300	
cgg gag tcc cca gta aaa gta gtc ggg gtt tac cgt tta att atg aaa	960
Arg Glu Ser Pro Val Lys Val Val Gly Val Tyr Arg Leu Ile Met Lys	
305 310 315 320	
agt aac tca gat aat ttt aga gaa agt gct atc aaa gat gtt att gac	1008
Ser Asn Ser Asp Asn Phe Arg Glu Ser Ala Ile Lys Asp Val Ile Asp	
325 330 335	
att ctt aaa agt aaa gac att aag ata att att tat gag cca atg tta	1056
Ile Leu Lys Ser Lys Asp Ile Lys Ile Ile Ile Tyr Glu Pro Met Leu	
340 345 350	
aac aaa ctt gaa tct gaa gat caa tct gta ctt gta aat gat tta gag	1104
Asn Lys Leu Glu Ser Glu Asp Gln Ser Val Leu Val Asn Asp Leu Glu	
355 360 365	
aat ttc aag aaa caa gca aat att atc gta act aat cgc tat gat aat	1152
Asn Phe Lys Lys Gln Ala Asn Ile Ile Val Thr Asn Arg Tyr Asp Asn	
370 375 380	
gaa tta caa gat gtt aaa aat aaa gtt tac agt aga gat att ttt aat	1200
Glu Leu Gln Asp Val Lys Asn Lys Val Tyr Ser Arg Asp Ile Phe Asn	
385 390 395 400	
aga gac	1206
Arg Asp	

<210> 97

<211> 402

<212> PRT

5 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 97

ES 2 362 354 T3

Met Lys Ile Ala Val Ala Gly Ser Gly Tyr Val Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Leu Ser Leu Gln Asn Glu Val Thr Ile Val Asp Ile Leu Pro
20 25 30

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

275	280	285
Val Arg Lys Ser Tyr Ile Ala Lys Gln Ile Ile Asn Val Leu Glu Glu 290	295	300
Arg Glu Ser Pro Val Lys Val Val Gly Val Tyr Arg Leu Ile Met Lys 305	310	315
Ser Asn Ser Asp Asn Phe Arg Glu Ser Ala Ile Lys Asp Val Ile Asp 325	330	335
Ile Leu Lys Ser Lys Asp Ile Lys Ile Ile Ile Tyr Glu Pro Met Leu 340	345	350
Asn Lys Leu Glu Ser Glu Asp Gln Ser Val Leu Val Asn Asp Leu Glu 355	360	365
Asn Phe Lys Lys Gln Ala Asn Ile Ile Val Thr Asn Arg Tyr Asp Asn 370	375	380
Glu Leu Gln Asp Val Lys Asn Lys Val Tyr Ser Arg Asp Ile Phe Asn 385	390	395
400		

Arg Asp

<210> 98

<211> 912

<212> ADN

5 <213> Streptococcus pyogenes

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(912)

10 <223>

<400> 98

atg	acc	aaa	gtc	aga	aaa	gcc	att	att	cct	gct	gca	ggt	cta	gga	aca	48
Met	Thr	Lys	Val	Arg	Lys	Ala	Ile	Ile	Pro	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Thr	
1				5					10					15		
cgt	ttt	tta	cct	gct	acc	aaa	gct	ctt	gcc	aaa	gag	atg	ttg	ccc	atc	96
Arg	Phe	Leu	Pro	Ala	Thr	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Glu	Met	Leu	Pro	Ile	
			20					25					30			
gtt	gat	aaa	cca	acc	atc	cag	ttt	atc	gtc	gaa	gaa	gcg	cta	aaa	tct	144
Val	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Gln	Phe	Ile	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Ser	
		35					40					45				
ggc	atc	gag	gaa	atc	ctt	gtg	gtg	acc	gga	aaa	gct	aaa	cgc	tct	atc	192
Gly	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Lys	Ala	Lys	Arg	Ser	Ile	
	50					55					60					

gag gac cat ttt gat tca aac ttt gaa tta gaa tac aac ctc caa gct Glu Asp His Phe Asp Ser Asn Phe Glu Leu Glu Tyr Asn Leu Gln Ala 65 70 75 80	240
aag ggg aaa aat gaa ctg ttg aaa tta gtg gat gaa acc act gcc att Lys Gly Lys Asn Glu Leu Leu Lys Leu Val Asp Glu Thr Thr Ala Ile 85 90 95	288
aac ctt cat ttt atc cgt caa agc cac cca aga ggg ctg gga gat gct Asn Leu His Phe Ile Arg Gln Ser His Pro Arg Gly Leu Gly Asp Ala 100 105 110	336
gtc tta caa gcc aaa gcc ttt gtg ggc aat gaa ccc ttt gtg gtc atg Val Leu Gln Ala Lys Ala Phe Val Gly Asn Glu Pro Phe Val Val Met 115 120 125	384
ctt gga gat gac tta atg gac att aca aat gca tcc gct aaa cct ctc Leu Gly Asp Asp Leu Met Asp Ile Thr Asn Ala Ser Ala Lys Pro Leu 130 135 140	432
acc aaa caa ctc atg gag gac tat gac aag acg cat gca tcc act atc Thr Lys Gln Leu Met Glu Asp Tyr Asp Lys Thr His Ala Ser Thr Ile 145 150 155 160	480
gct gtg atg aaa gtt cct cat gaa gat gtg tct agc tat ggg gtt atc Ala Val Met Lys Val Pro His Glu Asp Val Ser Ser Tyr Gly Val Ile 165 170 175	528
gct cct caa ggc aag gct gtc aag ggc ctt tac agt gta gac acc ttt Ala Pro Gln Gly Lys Ala Val Lys Gly Leu Tyr Ser Val Asp Thr Phe 180 185 190	576
gtt gaa aaa cca caa cca gaa gat gcg cct agt gat ttg gct att att Val Glu Lys Pro Gln Pro Glu Asp Ala Pro Ser Asp Leu Ala Ile Ile 195 200 205	624
ggc cgt tac ctc cta acc cct gaa att ttt ggt att ttg gaa aga cag Gly Arg Tyr Leu Leu Thr Pro Glu Ile Phe Gly Ile Leu Glu Arg Gln 210 215 220	672
acc cct gga gca ggt aac gaa gtg caa ctc aca gat gct atc gat acc Thr Pro Gly Ala Gly Asn Glu Val Gln Leu Thr Asp Ala Ile Asp Thr 225 230 235 240	720
ctc aat aaa act cag cgt gtc ttt gca cga gaa ttt aaa ggc aat cgt Leu Asn Lys Thr Gln Arg Val Phe Ala Arg Glu Phe Lys Gly Asn Arg 245 250 255	768
tac gat gtt ggg gat aaa ttt gga ttc atg aaa aca tct atc gac tat Tyr Asp Val Gly Asp Lys Phe Gly Phe Met Lys Thr Ser Ile Asp Tyr 260 265 270	816
gcc tta gaa cac cca cag gtc aaa gag gac ttg aaa aat tac att atc Ala Leu Glu His Pro Gln Val Lys Glu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Ile 275 280 285	864
aaa cta gga aaa gct ttg gaa aaa agt aaa gta cca aca cat tca aag Lys Leu Gly Lys Ala Leu Glu Lys Ser Lys Val Pro Thr His Ser Lys 290 295 300	912

<210> 99

<211> 304

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

5

<400> 99

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

Arg Phe Leu Pro Ala Thr Lys Ala Leu Ala Lys Glu Met Leu Pro Ile
 20 25 30

Val Asp Lys Pro Thr Ile Gln Phe Ile Val Glu Glu Ala Leu Lys Ser
 35 40 45

Gly Ile Glu Glu Ile Leu Val Val Thr Gly Lys Ala Lys Arg Ser Ile
 50 55 60

Glu Asp His Phe Asp Ser Asn Phe Glu Leu Glu Tyr Asn Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Lys Gly Lys Asn Glu Leu Leu Lys Leu Val Asp Glu Thr Thr Ala Ile
 85 90 95

Asn Leu His Phe Ile Arg Gln Ser His Pro Arg Gly Leu Gly Asp Ala
 100 105 110

Val Leu Gln Ala Lys Ala Phe Val Gly Asn Glu Pro Phe Val Val Met
 115 120 125

Leu Gly Asp Asp Leu Met Asp Ile Thr Asn Ala Ser Ala Lys Pro Leu
 130 135 140

Thr Lys Gln Leu Met Glu Asp Tyr Asp Lys Thr His Ala Ser Thr Ile
 145 150 155 160

Ala Val Met Lys Val Pro His Glu Asp Val Ser Ser Tyr Gly Val Ile
 165 170 175

Ala Pro Gln Gly Lys Ala Val Lys Gly Leu Tyr Ser Val Asp Thr Phe
 180 185 190

Val Glu Lys Pro Gln Pro Glu Asp Ala Pro Ser Asp Leu Ala Ile Ile
 195 200 205

Gly Arg Tyr Leu Leu Thr Pro Glu Ile Phe Gly Ile Leu Glu Arg Gln

210		215		220											
Thr	Pro	Gly	Ala	Gly	Asn	Glu	Val	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Ile	Asp	Thr
225					230					235					240
Leu	Asn	Lys	Thr	Gln	Arg	Val	Phe	Ala	Arg	Glu	Phe	Lys	Gly	Asn	Arg
				245					250					255	
Tyr	Asp	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Gly	Phe	Met	Lys	Thr	Ser	Ile	Asp	Tyr
			260					265					270		
Ala	Leu	Glu	His	Pro	Gln	Val	Lys	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ile
		275					280					285			
Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Lys	Ser	Lys	Val	Pro	Thr	His	Ser	Lys
290						295					300				

<210> 100

<211> 1347

<212> ADN

5 <213> Streptococcus equi zooepidemicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1347)

10 <223>

<400> 100

atg tca cat att aca ttt gat tat tca aag gtt ctt gag caa ttt gcc	48
Met Ser His Ile Thr Phe Asp Tyr Ser Lys Val Leu Glu Gln Phe Ala	
1 5 10 15	
gga cag cat gaa att gac ttt tta caa ggt cag gta aca gag gct gat	96
Gly Gln His Glu Ile Asp Phe Leu Gln Gly Gln Val Thr Glu Ala Asp	
20 25 30	
cag gca cta cgt cag ggc act gga cct gga tca gat ttc ttg ggc tgg	144
Gln Ala Leu Arg Gln Gly Thr Gly Pro Gly Ser Asp Phe Leu Gly Trp	
35 40 45	
ctt gag tta cct gaa aac tat gac aaa gaa gaa ttt gct cgt atc ctt	192
Leu Glu Leu Pro Glu Asn Tyr Asp Lys Glu Glu Phe Ala Arg Ile Leu	
50 55 60	
aaa gca gct gag aag att aag gct gac agt gac gtt ctt gtt gtg att	240
Lys Ala Ala Glu Lys Ile Lys Ala Asp Ser Asp Val Leu Val Val Ile	
65 70 75 80	
ggt att ggt ggc tct tac ctt ggt gct aag gct gca att gac ttt ttg	288
Gly Ile Gly Gly Ser Tyr Leu Gly Ala Lys Ala Ala Ile Asp Phe Leu	
85 90 95	
aac agc cat ttt gcc aac cta caa aca gca aaa gag cgc aaa gca cca	336
Asn Ser His Phe Ala Asn Leu Gln Thr Ala Lys Glu Arg Lys Ala Pro	
100 105 110	

caa att ctt tat gct ggt aac tcc atc tca tca agc tat ctt gct gat	384
Gln Ile Leu Tyr Ala Gly Asn Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Asp	
115 120 125	
ctt gtg gac tat gtt caa gat aaa gat ttc tct gtt aac gtg att tct	432
Leu Val Asp Tyr Val Gln Asp Lys Asp Phe Ser Val Asn Val Ile Ser	
130 135 140	
aag tct ggt aca aca aca gag cct gca atc gcc ttt cgt gtc ttt aaa	480
Lys Ser Gly Thr Thr Thr Glu Pro Ala Ile Ala Phe Arg Val Phe Lys	
145 150 155 160	
gaa tta ctt gtt aaa aag tac ggt caa gaa gag gcc aac aag cgt atc	528
Glu Leu Leu Val Lys Lys Tyr Gly Gln Glu Glu Ala Asn Lys Arg Ile	
165 170 175	
tat gca acg act gat aag gtc aag ggt gct gtt aag gtt gag gct gat	576
Tyr Ala Thr Thr Asp Lys Val Lys Gly Ala Val Lys Val Glu Ala Asp	
180 185 190	
gca aat cat tgg gaa acc ttt gtt gtg cca gat aat gtt ggt ggc cgt	624
Ala Asn His Trp Glu Thr Phe Val Val Pro Asp Asn Val Gly Gly Arg	
195 200 205	
ttc tca gtg ctg aca gct gtg ggc ttg cta cca att gca gca tca ggg	672
Phe Ser Val Leu Thr Ala Val Gly Leu Leu Pro Ile Ala Ala Ser Gly	
210 215 220	
gct gat att acc gcg ctg atg gaa gga gca aat gca gct cgt aag gac	720
Ala Asp Ile Thr Ala Leu Met Glu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Lys Asp	
225 230 235 240	
ctg tca tca gat aaa atc tca gaa aac atc gct tac caa tat gct gtg	768
Leu Ser Ser Asp Lys Ile Ser Glu Asn Ile Ala Tyr Gln Tyr Ala Val	
245 250 255	
gtc cgc aat atc ctc tat cgc aaa ggc tat gta act gaa att ttg gca	816
Val Arg Asn Ile Leu Tyr Arg Lys Gly Tyr Val Thr Glu Ile Leu Ala	
260 265 270	
aac tat gag cca tca ttg cag tat ttt agc gaa tgg tgg aag caa ctg	864
Asn Tyr Glu Pro Ser Leu Gln Tyr Phe Ser Glu Trp Trp Lys Gln Leu	
275 280 285	
gct ggt gag tct gaa gga aag gac caa aag ggt att tac cca act tca	912
Ala Gly Glu Ser Glu Gly Lys Asp Gln Lys Gly Ile Tyr Pro Thr Ser	
290 295 300	
gct aat ttc tcg aca gac ctg cat tct ctt ggt caa ttt atc caa gaa	960
Ala Asn Phe Ser Thr Asp Leu His Ser Leu Gly Gln Phe Ile Gln Glu	
305 310 315 320	
ggc tac cgt aac ctc ttt gag aca gtg att cgt gtg gac aag cca cgt	1008
Gly Tyr Arg Asn Leu Phe Glu Thr Val Ile Arg Val Asp Lys Pro Arg	
325 330 335	
caa aat gtg att atc cca gaa atg gct gag gac ctt gat ggc ctt ggc	1056
Gln Asn Val Ile Ile Pro Glu Met Ala Glu Asp Leu Asp Gly Leu Gly	
340 345 350	

tac cta caa gga aaa gac gtt gac ttt gtc aac aaa aaa gca aca gat	1104
Tyr Leu Gln Gly Lys Asp Val Asp Phe Val Asn Lys Lys Ala Thr Asp	
355 360 365	
ggt gtc ctt ctt gcc cat aca gat ggt ggt gtg cca aat atg ttt atc	1152
Gly Val Leu Leu Ala His Thr Asp Gly Gly Val Pro Asn Met Phe Ile	
370 375 380	
acg ctt cca gag caa gac gaa ttt aca cta ggc tat acg atc tac ttc	1200
Thr Leu Pro Glu Gln Asp Glu Phe Thr Leu Gly Tyr Thr Ile Tyr Phe	
385 390 395 400	
ttt gag ctt gct att gcc ctt tca ggc tac ctc aac ggg gtc aat cca	1248
Phe Glu Leu Ala Ile Ala Leu Ser Gly Tyr Leu Asn Gly Val Asn Pro	
405 410 415	
ttt gat cag cca ggc gtt gag gct tac aag aaa aac atg ttt gcc ctt	1296
Phe Asp Gln Pro Gly Val Glu Ala Tyr Lys Lys Asn Met Phe Ala Leu	
420 425 430	
ctt ggt aag cca ggc ttt gaa gag cta gga gca gcg ctc aac gca cgc	1344
Leu Gly Lys Pro Gly Phe Glu Glu Leu Gly Ala Ala Leu Asn Ala Arg	
435 440 445	
ttg	1347
Leu	

<210> 101

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Streptococcus equi zooepidemicus

<400> 101

Met Ser His Ile Thr Phe Asp Tyr Ser Lys Val Leu Glu Gln Phe Ala
 1 5 10 15

Gly Gln His Glu Ile Asp Phe Leu Gln Gly Gln Val Thr Glu Ala Asp
 20 25 30

Gln Ala Leu Arg Gln Gly Thr Gly Pro Gly Ser Asp Phe Leu Gly Trp
 35 40 45

Leu Glu Leu Pro Glu Asn Tyr Asp Lys Glu Glu Phe Ala Arg Ile Leu
 50 55 60

Lys Ala Ala Glu Lys Ile Lys Ala Asp Ser Asp Val Leu Val Val Ile
 65 70 75 80

Gly Ile Gly Gly Ser Tyr Leu Gly Ala Lys Ala Ala Ile Asp Phe Leu
 85 90 95

Asn Ser His Phe Ala Asn Leu Gln Thr Ala Lys Glu Arg Lys Ala Pro

100	105	110
Gln Ile Leu Tyr Ala Gly Asn Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Asp 115 120 125		
Leu Val Asp Tyr Val Gln Asp Lys Asp Phe Ser Val Asn Val Ile Ser 130 135 140		
Lys Ser Gly Thr Thr Thr Glu Pro Ala Ile Ala Phe Arg Val Phe Lys 145 150 155 160		
Glu Leu Leu Val Lys Lys Tyr Gly Gln Glu Glu Ala Asn Lys Arg Ile 165 170 175		
Tyr Ala Thr Thr Asp Lys Val Lys Gly Ala Val Lys Val Glu Ala Asp 180 185 190		
Ala Asn His Trp Glu Thr Phe Val Val Pro Asp Asn Val Gly Gly Arg 195 200 205		
Phe Ser Val Leu Thr Ala Val Gly Leu Leu Pro Ile Ala Ala Ser Gly 210 215 220		
Ala Asp Ile Thr Ala Leu Met Glu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Lys Asp 225 230 235 240		
Leu Ser Ser Asp Lys Ile Ser Glu Asn Ile Ala Tyr Gln Tyr Ala Val 245 250 255		
Val Arg Asn Ile Leu Tyr Arg Lys Gly Tyr Val Thr Glu Ile Leu Ala 260 265 270		
Asn Tyr Glu Pro Ser Leu Gln Tyr Phe Ser Glu Trp Trp Lys Gln Leu 275 280 285		
Ala Gly Glu Ser Glu Gly Lys Asp Gln Lys Gly Ile Tyr Pro Thr Ser 290 295 300		
Ala Asn Phe Ser Thr Asp Leu His Ser Leu Gly Gln Phe Ile Gln Glu 305 310 315 320		
Gly Tyr Arg Asn Leu Phe Glu Thr Val Ile Arg Val Asp Lys Pro Arg 325 330 335		
Gln Asn Val Ile Ile Pro Glu Met Ala Glu Asp Leu Asp Gly Leu Gly 340 345 350		

Tyr Leu Gln Gly Lys Asp Val Asp Phe Val Asn Lys Lys Ala Thr Asp
 355 360 365

Gly Val Leu Leu Ala His Thr Asp Gly Gly Val Pro Asn Met Phe Ile
 370 375 380

Thr Leu Pro Glu Gln Asp Glu Phe Thr Leu Gly Tyr Thr Ile Tyr Phe
 385 390 395 400

Phe Glu Leu Ala Ile Ala Leu Ser Gly Tyr Leu Asn Gly Val Asn Pro
 405 410 415

Phe Asp Gln Pro Gly Val Glu Ala Tyr Lys Lys Asn Met Phe Ala Leu
 420 425 430

Leu Gly Lys Pro Gly Phe Glu Glu Leu Gly Ala Ala Leu Asn Ala Arg
 435 440 445

Leu

<210> 102

<211> 1251

<212> ADN

5 <213> Streptococcus uberis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1251)

10 <223>

<400> 102

atg gaa aaa cta aaa aat ctc att aca ttt atg act ttt att ttc ctg	48
Met Glu Lys Leu Lys Asn Leu Ile Thr Phe Met Thr Phe Ile Phe Leu	
1 5 10 15	
tgg ctc ata att att ggg ctt aat gtt ttt gta ttt gga act aaa gga	96
Trp Leu Ile Ile Ile Gly Leu Asn Val Phe Val Phe Gly Thr Lys Gly	
20 25 30	
agt cta aca gtg tat ggg att att cta tta acc tat ttg tcg ata aaa	144
Ser Leu Thr Val Tyr Gly Ile Ile Leu Leu Thr Tyr Leu Ser Ile Lys	
35 40 45	
atg gga tta tct ttt ttt tat cgt ccc tat aaa gga agt gta ggt caa	192
Met Gly Leu Ser Phe Phe Tyr Arg Pro Tyr Lys Gly Ser Val Gly Gln	
50 55 60	
tat aag gta gca gct att atc cca tct tat aat gag gat ggt gtc ggt	240
Tyr Lys Val Ala Ala Ile Ile Pro Ser Tyr Asn Glu Asp Gly Val Gly	
65 70 75 80	

tta cta gaa act cta aag agt gtt caa aaa caa aca tat cca att gca Leu Leu Glu Thr Leu Lys Ser Val Gln Lys Gln Thr Tyr Pro Ile Ala 85 90 95	288
gaa att ttc gta att gac gat ggg tca gta gat aaa aca ggt ata aaa Glu Ile Phe Val Ile Asp Asp Gly Ser Val Asp Lys Thr Gly Ile Lys 100 105 110	336
ttg gtc gaa gac tat gtg aag tta aat ggc ttt gga gac caa gtt atc Leu Val Glu Asp Tyr Val Lys Leu Asn Gly Phe Gly Asp Gln Val Ile 115 120 125	384
ggt cat cag atg cct gaa aat gtt ggt aaa aga cat gct cag gct tgg Val His Gln Met Pro Glu Asn Val Gly Lys Arg His Ala Gln Ala Trp 130 135 140	432
gca ttt gaa agg tct gat gct gat gtt ttc tta aca gtg gat tca gat Ala Phe Glu Arg Ser Asp Ala Asp Val Phe Leu Thr Val Asp Ser Asp 145 150 155 160	480
acc tac atc tat cct gat gct ctt gaa gaa tta tta aag aca ttt aat Thr Tyr Ile Tyr Pro Asp Ala Leu Glu Glu Leu Leu Lys Thr Phe Asn 165 170 175	528
gat cca gag gtc tac gct gca act ggt cat tta aat gca aga aat aga Asp Pro Glu Val Tyr Ala Ala Thr Gly His Leu Asn Ala Arg Asn Arg 180 185 190	576
caa act aat ctc tta act aga ctg act gat att cgt tac gat aat gca Gln Thr Asn Leu Leu Thr Arg Leu Thr Asp Ile Arg Tyr Asp Asn Ala 195 200 205	624
ttt ggt gta gaa cgt gct get cag tct gtt acg gga aat att ttg gtt Phe Gly Val Glu Arg Ala Ala Gln Ser Val Thr Gly Asn Ile Leu Val 210 215 220	672
tgt tcc gga cct tta agt att tat aga cgt tcc gtc ggt att cca aat Cys Ser Gly Pro Leu Ser Ile Tyr Arg Arg Ser Val Gly Ile Pro Asn 225 230 235 240	720
ctt gaa cgc tat acc tca caa aca ttt ctt ggt gtc cct gta agc ata Leu Glu Arg Tyr Thr Ser Gln Thr Phe Leu Gly Val Pro Val Ser Ile 245 250 255	768
ggg gat gac cgt tgt ttg aca aat tat gca act gat ttg gga aaa acg Gly Asp Asp Arg Cys Leu Thr Asn Tyr Ala Thr Asp Leu Gly Lys Thr 260 265 270	816
ggt tat cag tca act gca aga tgt gat act gac gtt cca gat aag ttt Val Tyr Gln Ser Thr Ala Arg Cys Asp Thr Asp Val Pro Asp Lys Phe 275 280 285	864
aag gtt ttc atc aaa caa caa aat cgt tgg aat aag tca ttt ttt agg Lys Val Phe Ile Lys Gln Gln Asn Arg Trp Asn Lys Ser Phe Phe Arg 290 295 300	912
gag tct att atc tct gtt aag aag tta tta gcc aca cca agt gtt gct Glu Ser Ile Ile Ser Val Lys Lys Leu Leu Ala Thr Pro Ser Val Ala 305 310 315 320	960
ggt tgg act att aca gaa gtt tcc atg ttc atc atg cta gtt tat tct	1008

Val Trp Thr Ile Thr Glu Val Ser Met Phe Ile Met Leu Val Tyr Ser	
325	330
335	
atc ttt agc tta ttg ata gga gag gct caa gaa ttt aat ctc ata aaa	1056
Ile Phe Ser Leu Leu Ile Gly Glu Ala Gln Glu Phe Asn Leu Ile Lys	
340	345
350	
ctg gtt gct ttt tta gtt att att ttc ata gta gct ctt tgt aga aat	1104
Leu Val Ala Phe Leu Val Ile Ile Phe Ile Val Ala Leu Cys Arg Asn	
355	360
365	
gtt cat tac atg gtt aag cat cca ttt gct ttt tta ttg tca ccg ttt	1152
Val His Tyr Met Val Lys His Pro Phe Ala Phe Leu Leu Ser Pro Phe	
370	375
380	
tat gga ttg ata cat cta ttc gtt ttg caa cct ctt aag ata tat tcg	1200
Tyr Gly Leu Ile His Leu Phe Val Leu Gln Pro Leu Lys Ile Tyr Ser	
385	390
395	400
tta ttt act ata aga aat gct aca tgg gga act cgt aaa aag aca agt	1248
Leu Phe Thr Ile Arg Asn Ala Thr Trp Gly Thr Arg Lys Lys Thr Ser	
405	410
415	
aaa	1251
Lys	

<210> 103

<211> 417

<212> PRT

5 <213> Streptococcus uberis

<400> 103

Met Glu Lys Leu Lys Asn Leu Ile Thr Phe Met Thr Phe Ile Phe Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Ile Ile Ile Gly Leu Asn Val Phe Val Phe Gly Thr Lys Gly
 20 25 30

Ser Leu Thr Val Tyr Gly Ile Ile Leu Leu Thr Tyr Leu Ser Ile Lys
 35 40 45

Met Gly Leu Ser Phe Phe Tyr Arg Pro Tyr Lys Gly Ser Val Gly Gln
 50 55 60

Tyr Lys Val Ala Ala Ile Ile Pro Ser Tyr Asn Glu Asp Gly Val Gly
 65 70 75 80

Leu Leu Glu Thr Leu Lys Ser Val Gln Lys Gln Thr Tyr Pro Ile Ala
 85 90 95

Glu Ile Phe Val Ile Asp Asp Gly Ser Val Asp Lys Thr Gly Ile Lys
 100 105 110

Leu Val Glu Asp Tyr Val Lys Leu Asn Gly Phe Gly Asp Gln Val Ile
 115 120 125

Val His Gln Met Pro Glu Asn Val Gly Lys Arg His Ala Gln Ala Trp
 130 135 140

Ala Phe Glu Arg Ser Asp Ala Asp Val Phe Leu Thr Val Asp Ser Asp
 145 150 155 160

Thr Tyr Ile Tyr Pro Asp Ala Leu Glu Glu Leu Leu Lys Thr Phe Asn
 165 170 175

Asp Pro Glu Val Tyr Ala Ala Thr Gly His Leu Asn Ala Arg Asn Arg
 180 185 190

Gln Thr Asn Leu Leu Thr Arg Leu Thr Asp Ile Arg Tyr Asp Asn Ala
 195 200 205

Phe Gly Val Glu Arg Ala Ala Gln Ser Val Thr Gly Asn Ile Leu Val
 210 215 220

Cys Ser Gly Pro Leu Ser Ile Tyr Arg Arg Ser Val Gly Ile Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Glu Arg Tyr Thr Ser Gln Thr Phe Leu Gly Val Pro Val Ser Ile
 245 250 255

Gly Asp Asp Arg Cys Leu Thr Asn Tyr Ala Thr Asp Leu Gly Lys Thr
 260 265 270

Val Tyr Gln Ser Thr Ala Arg Cys Asp Thr Asp Val Pro Asp Lys Phe
 275 280 285

Lys Val Phe Ile Lys Gln Gln Asn Arg Trp Asn Lys Ser Phe Phe Arg
 290 295 300

Glu Ser Ile Ile Ser Val Lys Lys Leu Leu Ala Thr Pro Ser Val Ala
 305 310 315 320

Val Trp Thr Ile Thr Glu Val Ser Met Phe Ile Met Leu Val Tyr Ser
 325 330 335

Ile Phe Ser Leu Leu Ile Gly Glu Ala Gln Glu Phe Asn Leu Ile Lys
 340 345 350

Leu Val Ala Phe Leu Val Ile Ile Phe Ile Val Ala Leu Cys Arg Asn
 355 360 365

Val His Tyr Met Val Lys His Pro Phe Ala Phe Leu Leu Ser Pro Phe
 370 375 380

Tyr Gly Leu Ile His Leu Phe Val Leu Gln Pro Leu Lys Ile Tyr Ser
 385 390 395 400

Leu Phe Thr Ile Arg Asn Ala Thr Trp Gly Thr Arg Lys Lys Thr Ser
 405 410 415

Lys

<210> 104

<211> 1203

<212> ADN

5 <213> Streptococcus uberis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1203)

10 <223>

<400> 104

gtg	aaa	att	gca	ggt	gca	ggt	tct	ggc	tat	ggt	ggc	cta	tca	tta	agt	48
Val	Lys	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	
1				5					10					15		
gta	tta	tta	gca	cag	aaa	aat	cct	ggt	aca	ggt	gta	gat	att	att	gag	96
Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Lys	Asn	Pro	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Ile	Glu	
			20					25					30			
aag	aaa	gta	aat	ctc	ata	aat	caa	aaa	caa	tca	cca	atc	cag	gat	ggt	144
Lys	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	Asn	Gln	Lys	Gln	Ser	Pro	Ile	Gln	Asp	Val	
		35					40					45				
gat	att	gaa	aac	tat	tta	aaa	gaa	aaa	aag	tta	caa	tta	aga	gct	act	192
Asp	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Leu	Gln	Leu	Arg	Ala	Thr	
	50					55					60					
cta	gac	gcc	gat	caa	gca	ttt	agg	gat	gca	gat	ata	cta	att	att	gct	240
Leu	Asp	Ala	Asp	Gln	Ala	Phe	Arg	Asp	Ala	Asp	Ile	Leu	Ile	Ile	Ala	
65					70					75					80	
aca	cca	acc	aat	tat	gat	gtg	gag	aag	aat	ttt	ttt	gat	act	agt	cat	288
Thr	Pro	Thr	Asn	Tyr	Asp	Val	Glu	Lys	Asn	Phe	Phe	Asp	Thr	Ser	His	
			85						90					95		
gtt	gag	act	gta	att	gag	aaa	gct	tta	gct	tta	aat	agt	cag	gct	ttg	336
Val	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Gln	Ala	Leu	
			100					105					110			
tta	gtt	att	aaa	tca	acg	ata	cca	ctt	ggc	ttt	att	aaa	aag	atg	cgt	384

Leu Val	Ile	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Leu	Gly	Phe	Ile	Lys	Lys	Met	Arg	
	115					120					125				
caa aaa	tat	cag	aca	gac	cg	att	att	ttt	agt	ccc	gaa	ttt	ctt	aga	432
Gln Lys	Tyr	Gln	Thr	Asp	Arg	Ile	Ile	Phe	Ser	Pro	Glu	Phe	Leu	Arg	
	130				135					140					
gag tet	aaa	gct	tta	aaa	gat	aat	ctt	tat	cct	agt	cga	ata	att	gtt	480
Glu Ser	Lys	Ala	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ser	Arg	Ile	Ile	Val	
145				150					155					160	
tcc ttt	gaa	gat	gat	gat	tct	atg	gaa	gta	ata	gaa	gca	gca	aag	act	528
Ser Phe	Glu	Asp	Asp	Asp	Ser	Met	Glu	Val	Ile	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	
			165					170					175		
ttt gct	caa	ttg	tta	aaa	gat	ggt	tct	ttg	gat	aaa	gat	ggt	cct	gta	576
Phe Ala	Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Gly	Ser	Leu	Asp	Lys	Asp	Val	Pro	Val	
	180						185					190			
ctt ttt	atg	ggt	tca	gca	gag	gct	gaa	gca	gta	aaa	tta	ttt	gcc	aat	624
Leu Phe	Met	Gly	Ser	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Leu	Phe	Ala	Asn	
	195					200					205				
acc tat	tta	gct	atg	cg	gtc	tcc	tat	ttt	aat	gag	tta	gat	aca	tat	672
Thr Tyr	Leu	Ala	Met	Arg	Val	Ser	Tyr	Phe	Asn	Glu	Leu	Asp	Thr	Tyr	
	210				215					220					
gct gaa	aag	aat	ggt	tta	cg	gtg	gat	aat	att	att	gag	ggc	ggt	tgc	720
Ala Glu	Lys	Asn	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Asn	Ile	Ile	Glu	Gly	Val	Cys	
225				230					235					240	
cat gat	cga	cg	ata	gga	att	cat	tat	aat	aac	cct	tct	ttt	ggc	tat	768
His Asp	Arg	Arg	Ile	Gly	Ile	His	Tyr	Asn	Asn	Pro	Ser	Phe	Gly	Tyr	
			245					250					255		
gga gga	tac	tgc	tta	cct	aaa	gat	acc	aaa	cag	ttg	cta	gca	ggc	tat	816
Gly Gly	Tyr	Cys	Leu	Pro	Lys	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Leu	Ala	Gly	Tyr	
	260						265					270			
gat ggt	att	cct	caa	tcg	ctt	ata	aaa	gca	att	ggt	gat	tct	aat	aaa	864
Asp Gly	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Ser	Asn	Lys	
	275					280					285				
att cgt	aaa	gag	tat	atc	gca	tca	caa	att	tta	caa	caa	ttg	agt	gat	912
Ile Arg	Lys	Glu	Tyr	Ile	Ala	Ser	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Asp	
	290				295					300					
att aat	gta	gat	cct	aaa	gat	gca	acg	att	ggt	att	tac	cg	ctt	atc	960
Ile Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Asp	Ala	Thr	Ile	Gly	Ile	Tyr	Arg	Leu	Ile	
305				310					315					320	
atg aaa	agt	aac	tct	gat	aat	ttc	aga	gag	agt	gca	ata	aaa	gat	att	1008
Met Lys	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Phe	Arg	Glu	Ser	Ala	Ile	Lys	Asp	Ile	
			325					330					335		
att gat	cat	att	aag	agc	tat	caa	att	aat	ata	gtc	ttg	tat	gag	cca	1056
Ile Asp	His	Ile	Lys	Ser	Tyr	Gln	Ile	Asn	Ile	Val	Leu	Tyr	Glu	Pro	
	340					345					350				
atg atg	aat	gaa	gat	ttt	gat	tta	cca	atc	att	gat	gat	tta	tct	gac	1104
Met Met	Asn	Glu	Asp	Phe	Asp	Leu	Pro	Ile	Ile	Asp	Asp	Leu	Ser	Asp	

	355		360		365													
	ttc	aaa	gcc	atg	tca	cat	att	atc	ggt	tca	aat	aga	tat	gat	tta	gcc		1152
	Phe	Lys	Ala	Met	Ser	His	Ile	Ile	Val	Ser	Asn	Arg	Tyr	Asp	Leu	Ala		
		370					375				380							
	tta	gaa	gat	ggt	aaa	gaa	aaa	ggt	tac	acc	aga	gat	att	tac	ggt	gtg		1200
	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Glu	Lys	Val	Tyr	Thr	Arg	Asp	Ile	Tyr	Gly	Val		
	385				390					395					400			
	gat																	1203
	Asp																	

<210> 105

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Streptococcus uberis

<400> 105

Val Lys Ile Ala Val Ala Gly Ser Gly Tyr Val Gly Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Gln Lys Asn Pro Val Thr Val Val Asp Ile Ile Glu
 20 25 30

Lys Lys Val Asn Leu Ile Asn Gln Lys Gln Ser Pro Ile Gln Asp Val
 35 40 45

Asp Ile Glu Asn Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Leu Gln Leu Arg Ala Thr
 50 55 60

Leu Asp Ala Asp Gln Ala Phe Arg Asp Ala Asp Ile Leu Ile Ile Ala
 65 70 75 80

Thr Pro Thr Asn Tyr Asp Val Glu Lys Asn Phe Phe Asp Thr Ser His
 85 90 95

Val Glu Thr Val Ile Glu Lys Ala Leu Ala Leu Asn Ser Gln Ala Leu
 100 105 110

Leu Val Ile Lys Ser Thr Ile Pro Leu Gly Phe Ile Lys Lys Met Arg
 115 120 125

Gln Lys Tyr Gln Thr Asp Arg Ile Ile Phe Ser Pro Glu Phe Leu Arg
 130 135 140

Glu Ser Lys Ala Leu Lys Asp Asn Leu Tyr Pro Ser Arg Ile Ile Val
 145 150 155 160

Ser Phe Glu Asp Asp Asp Ser Met Glu Val Ile Glu Ala Ala Lys Thr
 165 170 175

Phe Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gly Ser Leu Asp Lys Asp Val Pro Val
 180 185 190

Leu Phe Met Gly Ser Ala Glu Ala Glu Ala Val Lys Leu Phe Ala Asn
 195 200 205

Thr Tyr Leu Ala Met Arg Val Ser Tyr Phe Asn Glu Leu Asp Thr Tyr
 210 215 220

Ala Glu Lys Asn Gly Leu Arg Val Asp Asn Ile Ile Glu Gly Val Cys
 225 230 235 240

His Asp Arg Arg Ile Gly Ile His Tyr Asn Asn Pro Ser Phe Gly Tyr
 245 250 255

Gly Gly Tyr Cys Leu Pro Lys Asp Thr Lys Gln Leu Leu Ala Gly Tyr
 260 265 270

Asp Gly Ile Pro Gln Ser Leu Ile Lys Ala Ile Val Asp Ser Asn Lys
 275 280 285

Ile Arg Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Gln Ile Leu Gln Gln Leu Ser Asp
 290 295 300

Ile Asn Val Asp Pro Lys Asp Ala Thr Ile Gly Ile Tyr Arg Leu Ile
 305 310 315 320

Met Lys Ser Asn Ser Asp Asn Phe Arg Glu Ser Ala Ile Lys Asp Ile
 325 330 335

Ile Asp His Ile Lys Ser Tyr Gln Ile Asn Ile Val Leu Tyr Glu Pro
 340 345 350

Met Met Asn Glu Asp Phe Asp Leu Pro Ile Ile Asp Asp Leu Ser Asp
 355 360 365

Phe Lys Ala Met Ser His Ile Ile Val Ser Asn Arg Tyr Asp Leu Ala
 370 375 380

Leu Glu Asp Val Lys Glu Lys Val Tyr Thr Arg Asp Ile Tyr Gly Val
 385 390 395 400

Asp

<210> 106

<211> 912

<212> ADN

5 <213> Streptococcus uberis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(912)

10 <223>

<400> 106

atg act aaa gta aga aaa gcc att att cca gct gcc gga ctt ggc aca	48
Met Thr Lys Val Arg Lys Ala Ile Ile Pro Ala Ala Gly Leu Gly Thr	
1 5 10 15	
cgt ttt tta cca gca aca aaa gct ctc gct aag gaa atg ttg ccc atc	96
Arg Phe Leu Pro Ala Thr Lys Ala Leu Ala Lys Glu Met Leu Pro Ile	
20 25 30	
gtt gac aaa cca acc att caa ttc atc gtg gaa gaa gct ttg cgt tct	144
Val Asp Lys Pro Thr Ile Gln Phe Ile Val Glu Glu Ala Leu Arg Ser	
35 40 45	
ggc att gaa gaa atc ttg gtc gta aca gga aaa tca aaa cgc tcc att	192
Gly Ile Glu Glu Ile Leu Val Val Thr Gly Lys Ser Lys Arg Ser Ile	
50 55 60	
gaa gac cat ttt gat tcc aac ttt gaa ctc gaa tat aat ttg caa gaa	240
Glu Asp His Phe Asp Ser Asn Phe Glu Leu Glu Tyr Asn Leu Gln Glu	
65 70 75 80	
aaa ggg aaa act gaa ctc tta aaa tta gtt gat gaa acc act tct ata	288
Lys Gly Lys Thr Glu Leu Leu Lys Leu Val Asp Glu Thr Thr Ser Ile	
85 90 95	
aac ttg cat ttc att cgt caa agt cat ccc aaa ggc tta ggg gat gct	336
Asn Leu His Phe Ile Arg Gln Ser His Pro Lys Gly Leu Gly Asp Ala	
100 105 110	
gtt tta caa gca aaa gct ttt gta gga aat gaa ccc ttc att gtt atg	384
Val Leu Gln Ala Lys Ala Phe Val Gly Asn Glu Pro Phe Ile Val Met	
115 120 125	
ctt ggt gac gat ttg atg gac att aca aat acc aaa gct gtc cca tta	432
Leu Gly Asp Asp Leu Met Asp Ile Thr Asn Thr Lys Ala Val Pro Leu	
130 135 140	
acc aaa caa tta atg gac gat tat gaa aca aca cat gct tct aca ata	480
Thr Lys Gln Leu Met Asp Asp Tyr Glu Thr Thr His Ala Ser Thr Ile	
145 150 155 160	
gcc gta atg aaa gtt cct cac gat gac gta tcc tct tat ggt gtc att	528
Ala Val Met Lys Val Pro His Asp Asp Val Ser Ser Tyr Gly Val Ile	
165 170 175	
gct cca aac ggc aaa gcc ttg aat ggc tta tat agc gtg gat acc ttt	576
Ala Pro Asn Gly Lys Ala Leu Asn Gly Leu Tyr Ser Val Asp Thr Phe	

	180		185		190											
ggt	gaa	aaa	cca	aaa	cct	gag	gac	gca	cca	agt	gac	ctt	gct	atc	att	624
Val	Glu	Lys	Pro	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Pro	Ser	Asp	Leu	Ala	Ile	Ile	
	195					200						205				
gga	cgt	tat	ctc	tta	aca	cct	gaa	att	ttt	gac	att	ctt	gaa	aat	caa	672
Gly	Arg	Tyr	Leu	Leu	Thr	Pro	Glu	Ile	Phe	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Gln	
	210					215					220					
gca	cca	ggt	gcc	gga	aac	gaa	gtc	caa	tta	act	gat	gct	atc	gat	acc	720
Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Asn	Glu	Val	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Ile	Asp	Thr	
225					230					235					240	
ctc	aac	aaa	aca	caa	cgt	gtt	ttt	gct	cgt	gag	ttt	act	ggc	aaa	cgc	768
Leu	Asn	Lys	Thr	Gln	Arg	Val	Phe	Ala	Arg	Glu	Phe	Thr	Gly	Lys	Arg	
				245					250					255		
tac	gat	ggt	gga	gac	aag	ttt	ggc	ttc	atg	aaa	aca	tct	atc	gat	tat	816
Tyr	Asp	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Gly	Phe	Met	Lys	Thr	Ser	Ile	Asp	Tyr	
			260					265					270			
gcc	cta	aaa	cac	cat	caa	gtc	aaa	gat	gac	cta	aaa	gct	tat	att	atc	864
Ala	Leu	Lys	His	His	Gln	Val	Lys	Asp	Asp	Leu	Lys	Ala	Tyr	Ile	Ile	
		275					280					285				
aag	tta	ggt	aaa	gaa	tta	gaa	aaa	gca	caa	gat	tcc	aaa	gaa	agc	aaa	912
Lys	Leu	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Gln	Asp	Ser	Lys	Glu	Ser	Lys	
	290					295					300					

<210> 107

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Streptococcus uberis

<400> 107

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

Arg Phe Leu Pro Ala Thr Lys Ala Leu Ala Lys Glu Met Leu Pro Ile
 20 25 30

Val Asp Lys Pro Thr Ile Gln Phe Ile Val Glu Glu Ala Leu Arg Ser
 35 40 45

Gly Ile Glu Glu Ile Leu Val Val Thr Gly Lys Ser Lys Arg Ser Ile
 50 55 60

Glu Asp His Phe Asp Ser Asn Phe Glu Leu Glu Tyr Asn Leu Gln Glu
 65 70 75 80

Lys Gly Lys Thr Glu Leu Leu Lys Leu Val Asp Glu Thr Thr Ser Ile
 85 90 95

Asn Leu His Phe Ile Arg Gln Ser His Pro Lys Gly Leu Gly Asp Ala
 100 105 110
 Val Leu Gln Ala Lys Ala Phe Val Gly Asn Glu Pro Phe Ile Val Met
 115 120 125
 Leu Gly Asp Asp Leu Met Asp Ile Thr Asn Thr Lys Ala Val Pro Leu
 130 135 140
 Thr Lys Gln Leu Met Asp Asp Tyr Glu Thr Thr His Ala Ser Thr Ile
 145 150 155 160
 Ala Val Met Lys Val Pro His Asp Asp Val Ser Ser Tyr Gly Val Ile
 165 170 175
 Ala Pro Asn Gly Lys Ala Leu Asn Gly Leu Tyr Ser Val Asp Thr Phe
 180 185 190
 Val Glu Lys Pro Lys Pro Glu Asp Ala Pro Ser Asp Leu Ala Ile Ile
 195 200 205
 Gly Arg Tyr Leu Leu Thr Pro Glu Ile Phe Asp Ile Leu Glu Asn Gln
 210 215 220
 Ala Pro Gly Ala Gly Asn Glu Val Gln Leu Thr Asp Ala Ile Asp Thr
 225 230 235 240
 Leu Asn Lys Thr Gln Arg Val Phe Ala Arg Glu Phe Thr Gly Lys Arg
 245 250 255
 Tyr Asp Val Gly Asp Lys Phe Gly Phe Met Lys Thr Ser Ile Asp Tyr
 260 265 270
 Ala Leu Lys His His Gln Val Lys Asp Asp Leu Lys Ala Tyr Ile Ile
 275 280 285
 Lys Leu Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ala Gln Asp Ser Lys Glu Ser Lys
 290 295 300

<210> 108

<211> 5158

<212> ADN

5 <213> Streptococcus equisimilis

<400> 108

lcaatttatg gctttttgct gatagcttac ctattagcca aatgtcctt atcctttttt 60

tacaagccat ttaaggggaag ggctgggcaa tataagggtg cagccattat tccctcttat	120
aacgaagatg ctgagtcatt gctagagacc ttaaaaagtg ttcagcagca aacctatccc	180
ctagcagaaa tttatgttgt tgacgatgga agtgctgatg agacaggtat taagcgcatt	240
gaagactatg tgcgtgacac tggtgacctt tcaagcaatg tcattgttca tcggtcagag	300
aaaaatcaag gaaagcgtca tgcacaggcc tgggcctttg aaagatcaga cgctgatgtc	360
tttttgaccg ttgactcaga tacttatatc taccctgatg ctttagagga gttgttaaaa	420
acctttaatg acccaactgt ttttgctgcg acgggtcacc ttaatgtcag aatagacaa	480
accaatctct taacacgctt gacagatatt cgctatgata atgcttttgg cgttgaacga	540
gctgcccaat ccggttacagg taatatcctt gtttgctcag gtccgcttag cgtttacaga	600
cgcgaggtgg ttgttcctaa catagataga tacatcaacc agaccttccct gggatttcct	660
gtaagtattg gtgatgacag gtgcttgacc aactatgcaa ctgatttagg aaagactggt	720
tatcaatcca ctgctaaatg tattacagat gttcctgaca agatgtctac ttacttgaag	780
cagcaaaacc gctggaacaa gtccttcttt agagagtcca ttatttctgt taagaaaatc	840
atgaacaatc cttttgtagc cctatggacc atacttgagg tgtctatggt tatgatgctt	900
gtttattctg tgggtgattt ctttgtaggc aatgtcagag aatttgattg gctcagggtt	960
ttagcctttc tggtgattat cttcattggt gccctgtgtc ggaacattca ttacatgctt	1020
aagcaccgcg tgccttctt gttatctccg ttttatgggg tgctgcattt gtttgccta	1080
cagcccttga aattatattc tctttttact attagaaatg ctgactgggg aacacgtaaa	1140
aaattattat aaaccaacta gacctagggt ctgacaaggg agctaagcta gggataaaca	1200
aagagttttg atccgactcg agcagctcat aaacgaaagc tatcccactt gtaattgaag	1260
ctaagagctt ttagccttga gctctataaa gacgaaccag aggctgagtg tcagctttgg	1320
tgtgagggct aggtcattat gatccttcag gtgtggcacc tgagctccgg cagtagctaa	1380
ctgtactaag gtatcaaagg aaaaaatgaa gtgaaaattt ctgtagcagg ctcaggatat	1440
gtcggcctat ccttgagtat tttactggca caacataatg acgtcactgt tgttgacatt	1500
attgatgaaa aggtgagatt gatcaatcaa ggcatatcgc caatcaagga tgctgatatt	1560
gaggagtatt taaaaaatgc gccgctaaat ctcacagcga cgcttgatgg cgcaagcgc	1620
tatagcaatg cagaccttat tatcattgct actccgacaa attatgacag cgaacgcaac	1680
tactttgaca caaggcatgt tgaagaggtc atcgagcagg tcctagacct aaatgcgtca	1740
gcaaccatta ttatcaaatc aaccatacca ctaggcttta tcaagcatgt tagggaaaaa	1800
taccagacag atcgtattat ttttagccca gaatttttaa gagaatcaaa agccttatac	1860
gataaccttt acccaagtcg gatcattggt tcttatgaaa aggacgactc accaagggtt	1920

attcaggctg ctaaagcctt tgctggctct ttaaaggaag gagccaaaag caaggatact 1980
 ccggctcttat ttatgggctc acaggaggct gaggcggctca agctattttgc gaataccttt 2040
 ttggctatgc ggggtgtctta ctttaatgaa ttagacacct attccgaaag caagggctca 2100
 gatgctcagc gcgtgattga aggagtctgt catgatcagc gcattggtaa ccattacaat 2160
 aacccttcct ttggatatgg cggctattgc ctgccaaaag acagcaagca gctgttggca 2220
 aattatagag gcattcccca gtccttgatg tcagcgattg ttgaatccaa caagatacga 2280
 aatcttatt tggctgaaca aatattagac agagcctcta gtcaaaagca ggctggtgta 2340
 ccattaaega ttggctttta ccgcttgatt atgaaaagca actctgataa tttccgagaa 2400
 agcgccatta aagatattat tgatatcatc aacgactatg gggttaatat tgtcatttac 2460
 gaacccatgc ttggcgagga tattggctac agggttgtca aggacttaga gcagttcaaa 2520
 aacgagtcta caatcattgt gtcaaatcgc tttgaggacg acctaggaga tgtcattgat 2580
 aaggtttata cgagagatgt ctttgggaaga gactagtcag aaaacgaatg gcactcataa 2640
 ggaaccacaa atcaaggagg aactcatgac aaaggtcaga aaagccatta tcccagccgc 2700
 cggcctagge actcgcttcc tgcccgccac caaggcactg gccaaaggaaa tgctcccaat 2760
 cgtcgataag ccaaccattc aattcatcgt cgaggaagcc ctaaaggcag gtatcgagga 2820
 gattcttgtc gtcaccggca aggccaaacg ctctatcgag gaccactttg actccaactt 2880
 cgagctcgaa tacaatctcc aagccaaggg caaaaccgag ctactcaagc tcgttgatga 2940
 gaccactgcc atcaacctgc acttcattcg tcagagccac cctagaggac taggggacgc 3000
 tgtcctccaa gccaaaggcct ttgttggcaa tgagcccttt gtggatcatgc tgggggatga 3060
 cctcatggat attaccaatc ctagtgccaa gcccttgacc aagcagetta ttgaggatta 3120
 tgattgcaca cacgocctca cgattgcagt gatgagggtg ccgcatgagg aggtttccaa 3180
 ttatgggtgtg attgcaccgc aaggggaaggc tgtaagggc ttgtatagtg tggagacctt 3240
 tgttgagaag ccaagtcag atgaggcacc gagtgactta gcgattattg gtcgatattt 3300
 gttgacgcct gagatttttg ccatattgga gaagcaggcg cctggagctg gcaatgaggt 3360
 acagctgacc gatgcgattg acaagctcaa taagacacag cgggtttttg cgagggagtt 3420
 taagggagag cggtatgatg ttggggacaa gtttggcttt atgaagacct cacttgacta 3480
 tgctctcaag caccctcagg tcaaggacga cctcactgac tacattataa agctcagtaa 3540
 gcaactgaac aaggacgtca agaaataggc gtttattgat cagctattgc agagctattt 3600
 aaaagcattt agagctttaa ggtgggatac tagaggattg gtatctcact ttttaggctg 3660
 acttgatta ataccaaaag ccaaaactag gcagataagc ataaggaatt agattaaaaa 3720

taaggaacca	aaacatgaaa	aactacgcca	ttatcctagc	agctggaaag	ggaacgcgca	3780
tgaagtcagc	gcttcccaag	gtgctgcaca	aggtatcagg	cctaagcatg	ctggagcatg	3840
tcctcaagag	tgtctcagcc	ctagcccctc	aaaagcagct	cacagtgatc	ggcatcagg	3900
cagagcaggt	gcgtgctgtc	ctaggagagc	aatcgctaac	agtggtgcaa	gaggagcagc	3960
tagggacagg	ccatgcagtc	atgatggcag	aagaggagct	atctggctta	gaggggcaaa	4020
ccctagtgat	tgcaggtgac	acccccttga	tcagaggaga	aagcctcaag	gctctgctag	4080
actatcatat	cagagaaaag	aatgtggcaa	ccattctcac	agccaatgcc	aaggatccct	4140
ttggctatgg	acgaatcatt	cgcaatgcag	caggagaggt	ggtcaacatc	gttgagcaaa	4200
aggatgctaa	tgaggcagag	caagaggtca	aggagatcaa	cacagggact	tatatctttg	4260
acaataagcg	cctttttgag	gctctaaagc	atctcacgac	tgataatgcc	caaggggagt	4320
actacctaac	cgatgtgatc	agtattttca	aggctggcca	agaaaggggt	ggcgcttacc	4380
tgctgaagga	ctttgatgag	agcctagggg	ttaatgatcg	cttagctcta	gcccaggccg	4440
aggtgattat	gcaagagcgg	atcaacaggc	agcacatgct	taatggggtg	accctgcaaa	4500
acccggcagc	tacctatatt	gaaagcagtg	tagagattgc	accagacgtc	ttgattgaag	4560
ccaatgtgac	cttaaagggg	cagactagaa	ttggcagcag	aagtgtcata	agcaatggga	4620
gctatatcct	tgattcgagg	cttggtgagg	gtgtagtggg	tagccagtcg	gtgattgagg	4680
cttcagtctt	agcagatgga	gtgacagtag	ggccatatgc	acacattcgc	ccggactccc	4740
agctcgatga	gtgtgttcat	attgggaact	ttgtagaggt	taaggggtct	catctagggg	4800
ccaataccaa	ggcagggcat	ttgacttacc	tggggaatgc	cgagattggc	tcagaggtta	4860
acattggtgc	aggaagcatt	acggttaatt	atgatggcca	acggaaatac	cagacagtga	4920
ttggcgatca	cgcttttatt	gggagtcatt	cgactttgat	agctccggta	gaggttgggg	4980
agaatgcttt	aacagcagca	gggtctacga	tagcccagtc	agtgccggca	gacagtgtgg	5040
ctatagggcg	cagccgtcag	gtggtgaagg	aaggctatgc	caagaggctg	ccgcaccacc	5100
caaatcaagc	ctaactcctc	aacccaaaaga	ggcaggtgag	aaaacctagg	ccattaaa	5158

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un ácido hialurónico, que comprende: (I) cultivo de una célula huésped de *Bacillus* bajo condiciones adecuadas para la producción del ácido hialurónico, donde la célula huésped de *Bacillus* comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende un operón artificial que comprende una secuencia codificante de hialuronano sintasa, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazada a una secuencia del promotor foránea a la secuencia codificante de hialuronano sintasa; donde
- (a) la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii);
- (b) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (II);
- (c) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (II);
- y (ii) recuperación del ácido hialurónico del medio de cultivo.
2. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 75% identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
3. Método según la reivindicación 2, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
4. Método según la reivindicación 3, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID

nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

5. Método según la reivindicación 4, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
6. Método según la reivindicación 5, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
7. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 75% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
8. Método según la reivindicación 7, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
9. Método según la reivindicación 8, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
10. Método según la reivindicación 9, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

11. Método según la reivindicación 10, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
12. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 75% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
13. Método según la reivindicación 12, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-lucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
14. Método según la reivindicación 13, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
15. Método según la reivindicación 14, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
16. Método según la reivindicación 15, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

17. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2, SEC ID NO:95, SEC ID n°: 93, o SEC ID n°: 103.
18. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 97, o SEC ID n°: 105.
19. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-lucosa pirofosforilasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 22, SEC ID n°: 43, SEC ID n°: 99, o SEC ID n°: 107.
20. Método según la reivindicación 1, donde el operón artificial además comprende una secuencia de tratamiento/estabilizante de ARNm localizada debajo de la secuencia del promotor y arriba de la secuencia codificante de hialuronano sintasa.
21. Método según la reivindicación 1, donde el operón artificial comprende un gen de hialuronano sintasa, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazada a un promotor corto de "consenso" de *amyQ* con la secuencia TTGACA para la región "- 35" y TATAAT para la región "-10".
22. Célula huésped de *Bacillus* que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende un operón artificial que comprende una secuencia codificante de hialuronano sintasa, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazada a una secuencia del promotor foránea a la secuencia codificante de hialuronano sintasa, donde
- (a) la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 95, SEC ID n°: 93, o SEC ID n°: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 94, SEC ID n°: 92, o SEC ID n°: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii);
- (b) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 41, SEC ID n°: 97, o SEC ID n°: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 11, SEC ID n°: 40, SEC ID n°: 96, o SEC ID n°: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii);
- (c) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de identidad a SEC ID n°: 22, SEC ID n°: 43, SEC ID n°: 99, o SEC ID n°: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID n°: 21, SEC ID n°: 42 o SEC ID n°: 98, o SEC ID n°: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

23. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 75% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
24. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 23, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
25. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 24, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
26. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 25, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
27. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 26, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad a SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 1, SEC ID nº: 94, SEC ID nº: 92, o SEC ID nº: 102 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
28. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 75% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
29. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 28, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de

astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

- 5 30. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 29, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 10
- 15 31. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 30, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 20
- 25 32. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 31, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa deshidrogenasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad a SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105 (ii); una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 96, o SEC ID nº: 104 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 30
- 35 33. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 75% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 40
34. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 33, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 35
- 40 35. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 34, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID

nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia altas con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

- 5 36. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 35, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID Nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 10
37. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 36, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa es seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad a SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta con SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 42 o SEC ID nº: 98, o SEC ID nº: 106 y (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
- 15
38. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2, SEC ID NO:95, SEC ID nº: 93, o SEC ID nº: 103.
- 20
39. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 97, o SEC ID nº: 105.
- 25
40. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 99, o SEC ID nº: 107.
- 30
41. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde el operón artificial además comprende una secuencia de tratamiento/estabilizante de ARNm localizada debajo de la secuencia del promotor y arriba de la secuencia codificante de hialuronano sintasa.
- 35
42. Célula huésped de *Bacillus* según la reivindicación 22, donde el operón artificial comprende un gen de hialuronano sintasa, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazada a un promotor corto de "consenso" de *amyQ* que tiene la secuencia TTGACA para la región "- 35" y TATAAT para la región "-10".

Ácido hialurónico

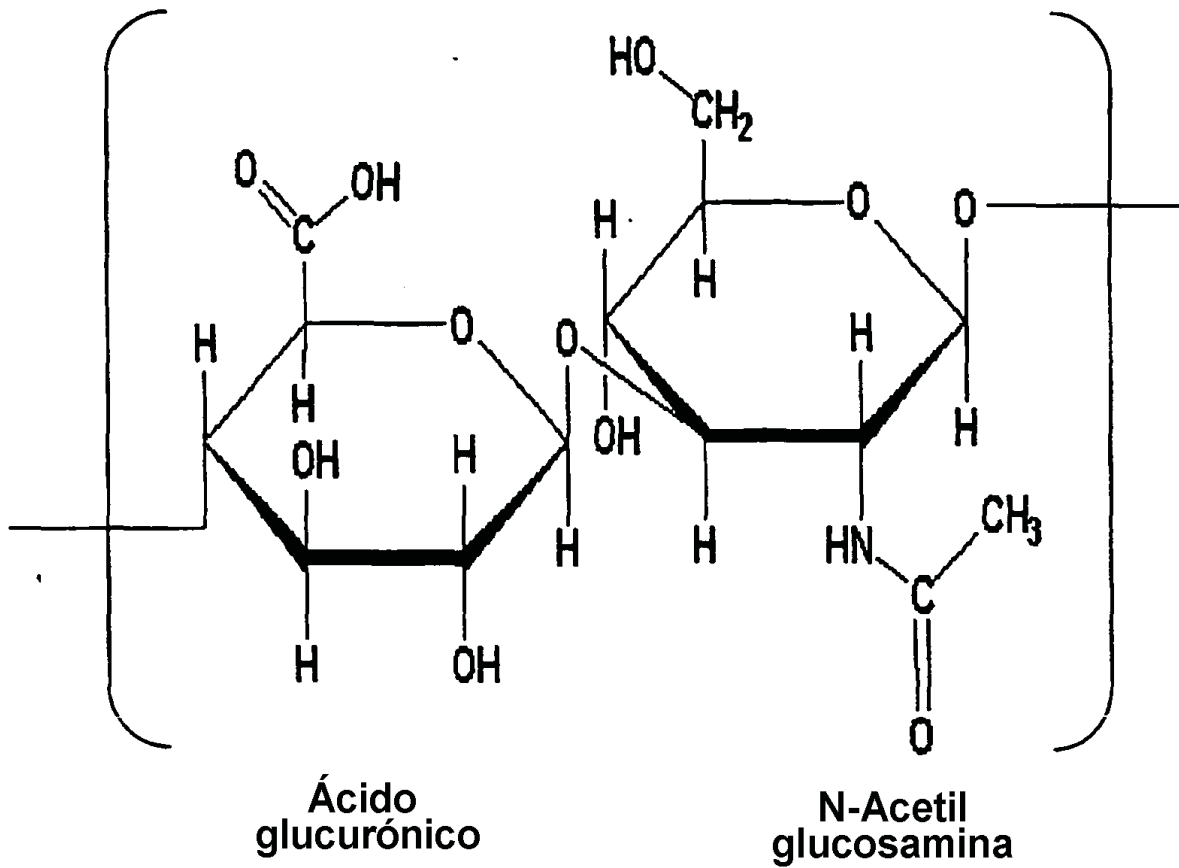


Fig. 1.

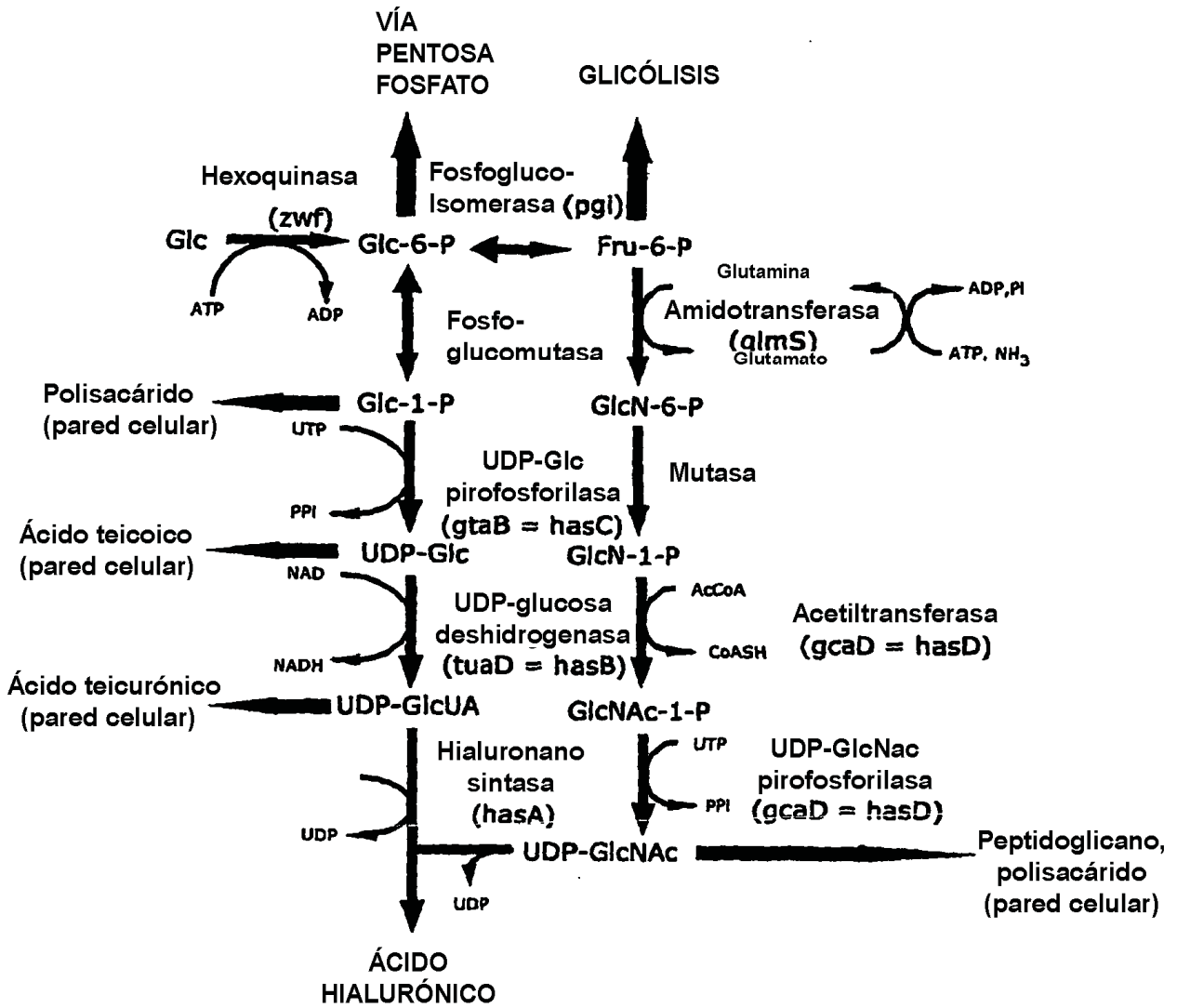


Fig. 2

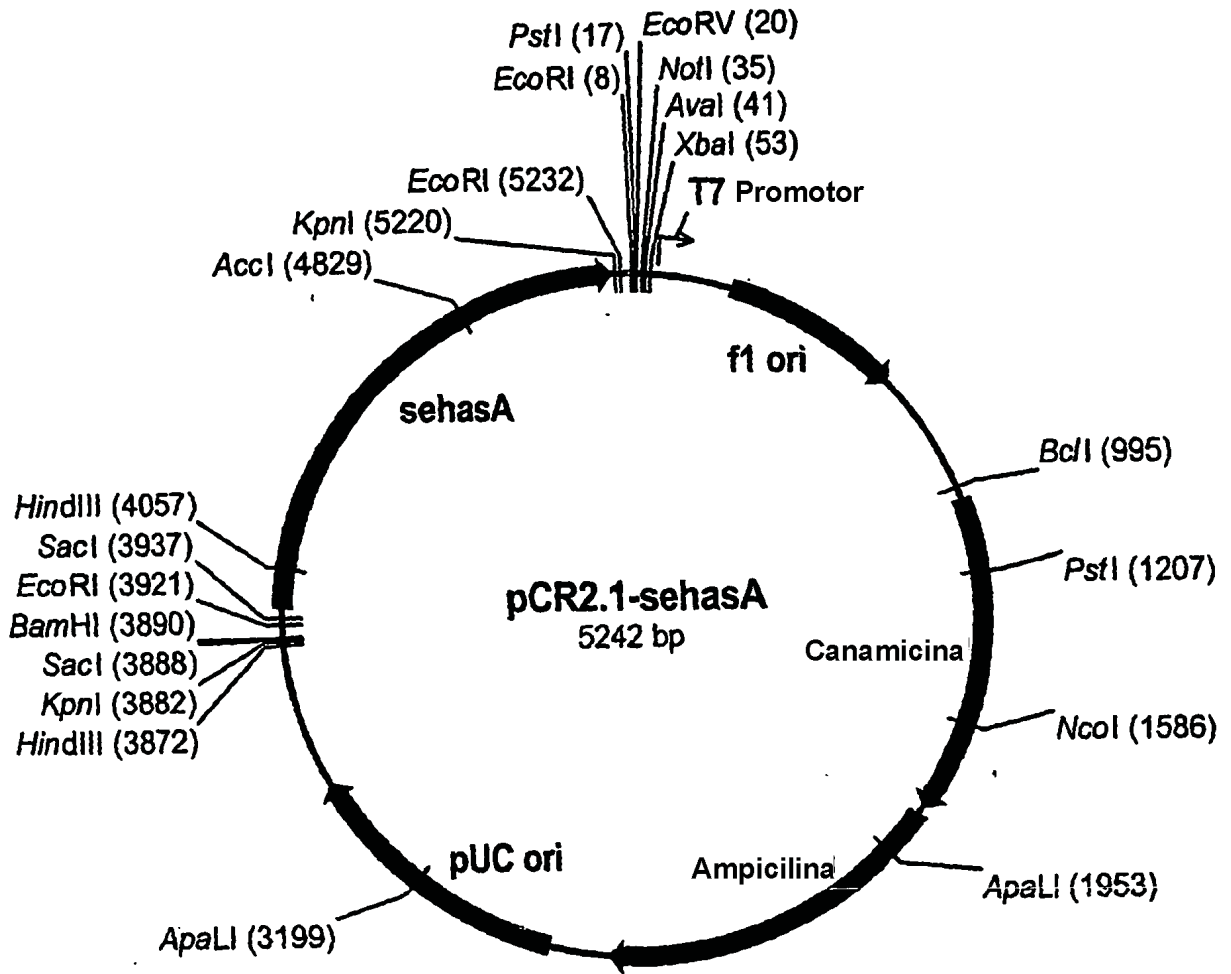


Fig. 3

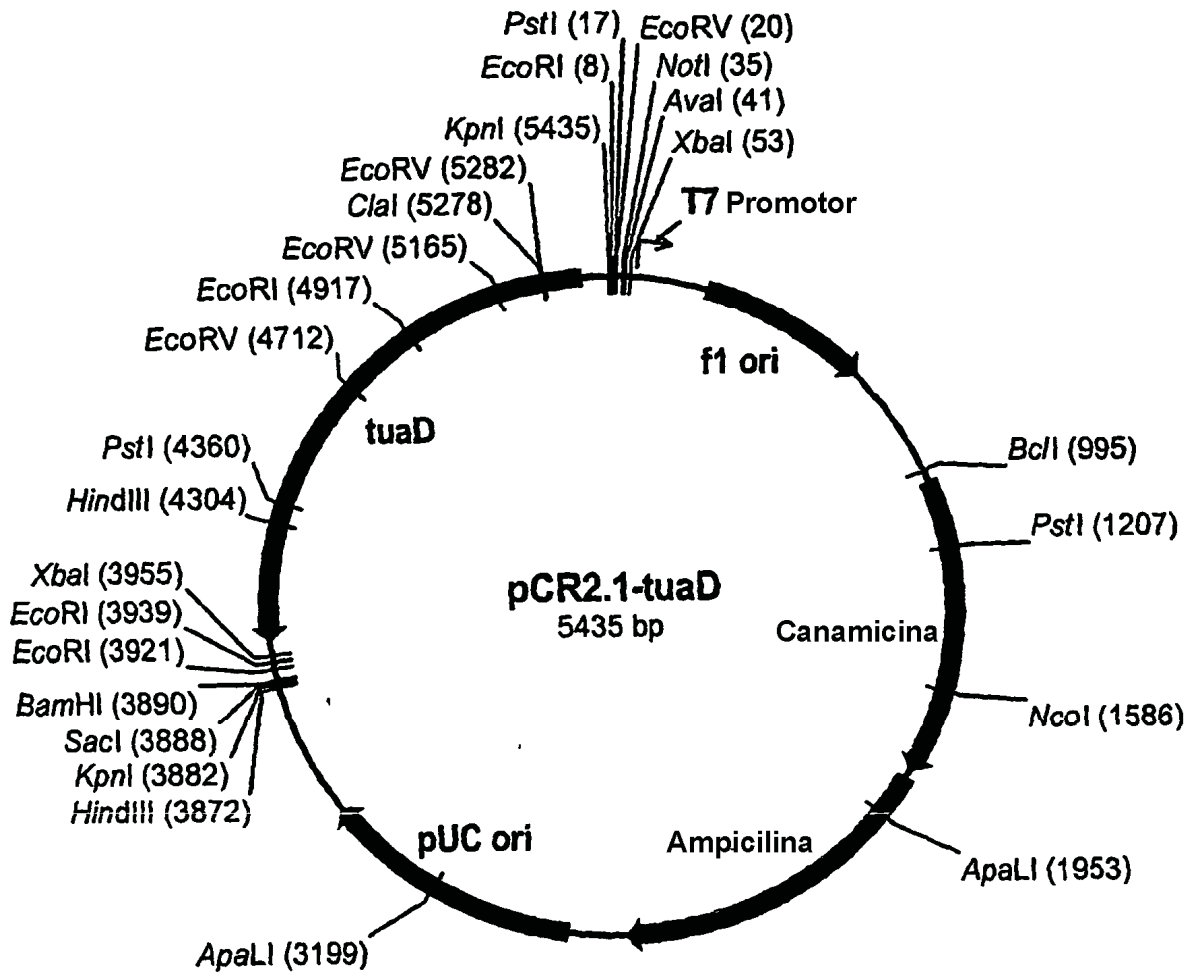


Fig. 4

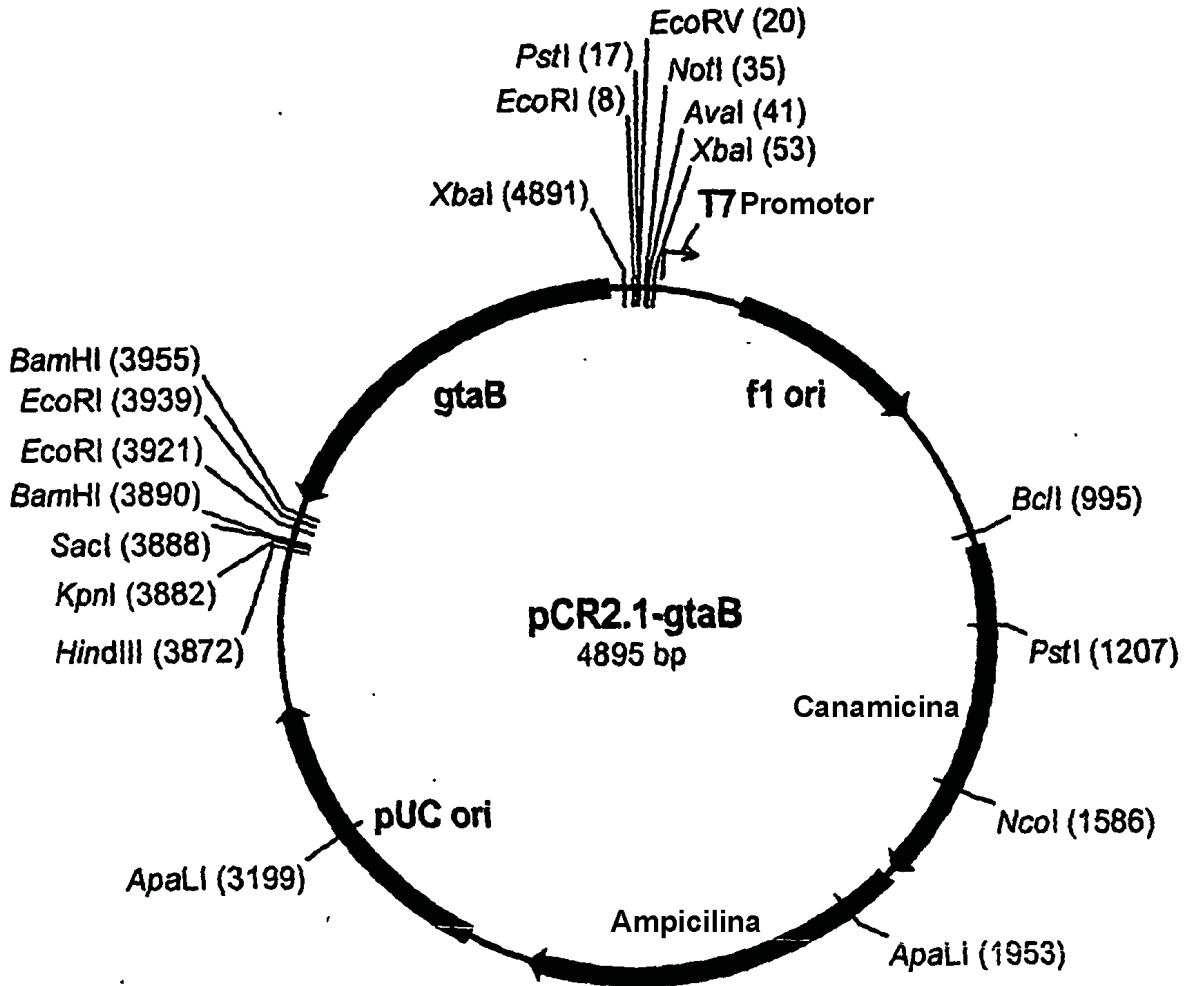


Fig. 5

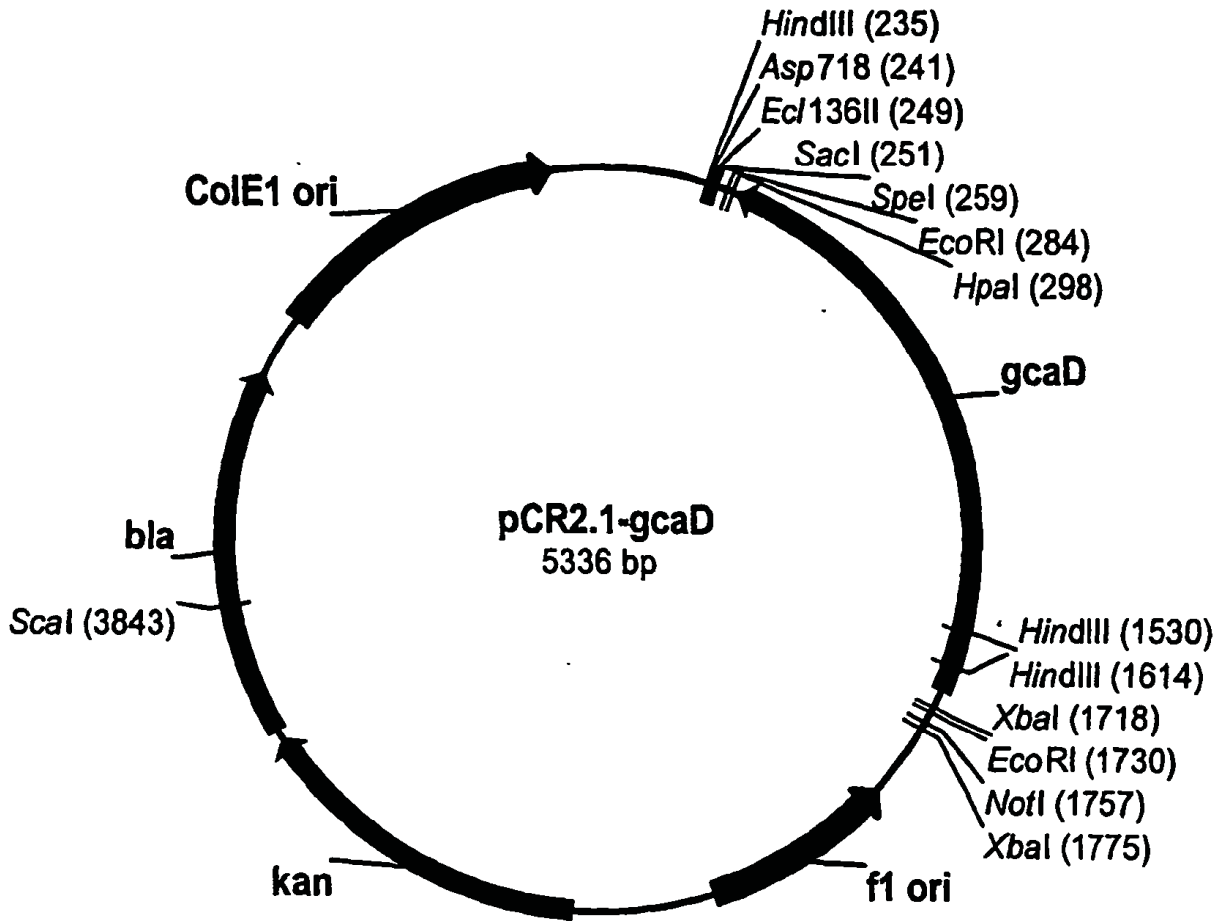


Fig. 6

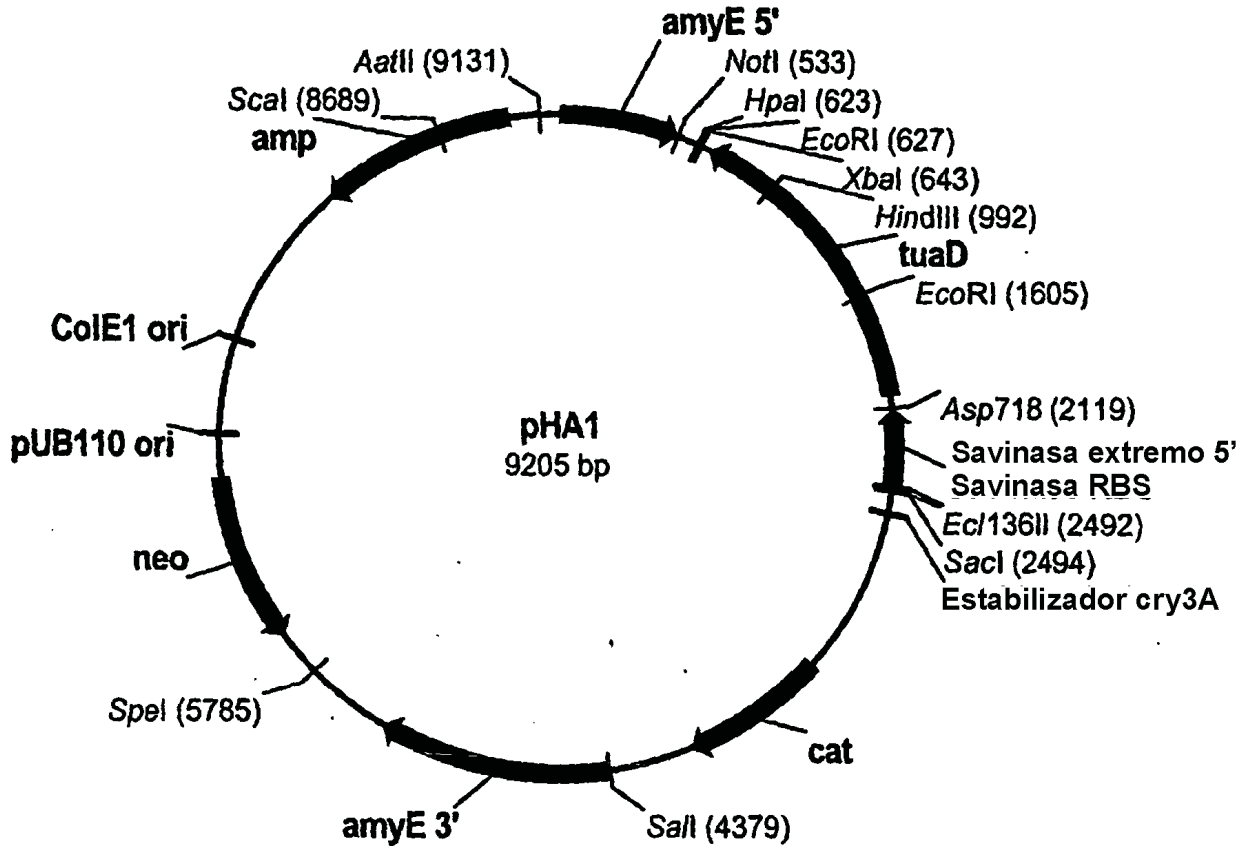


Fig. 7

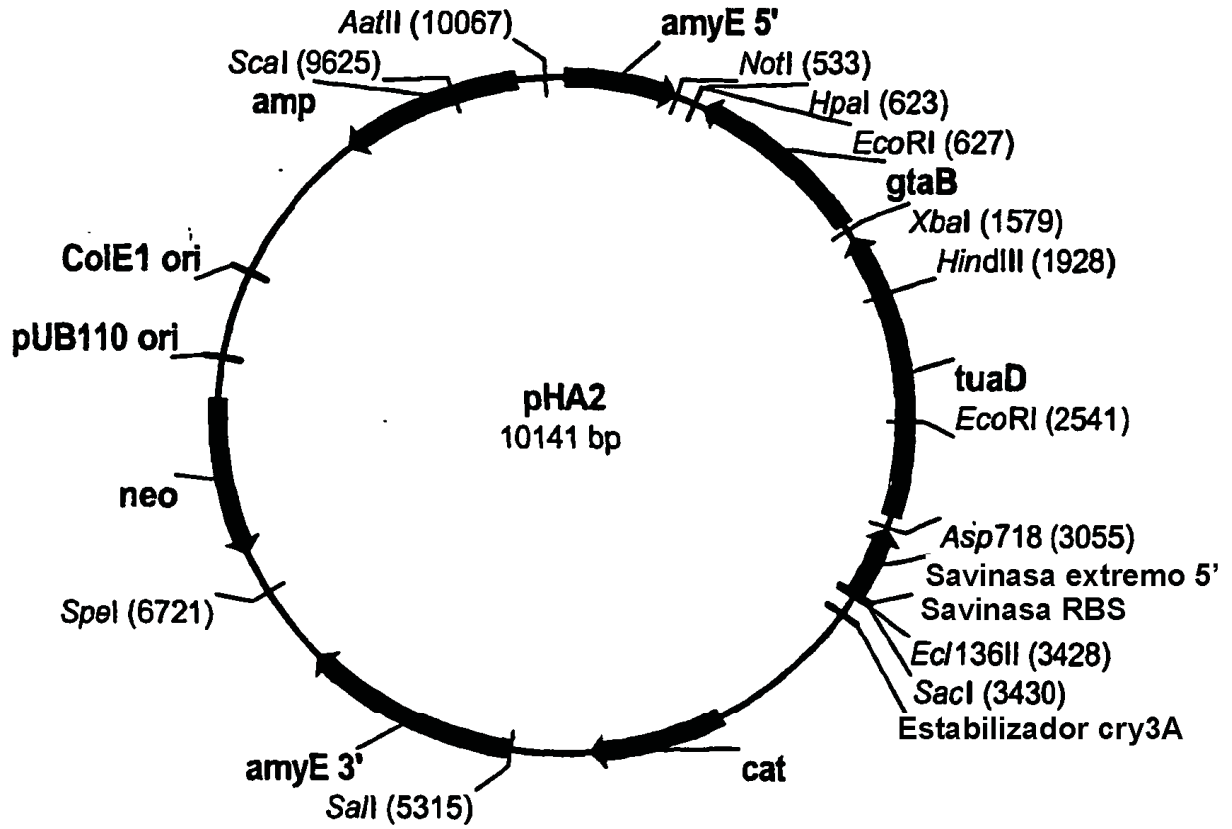


Fig. 8

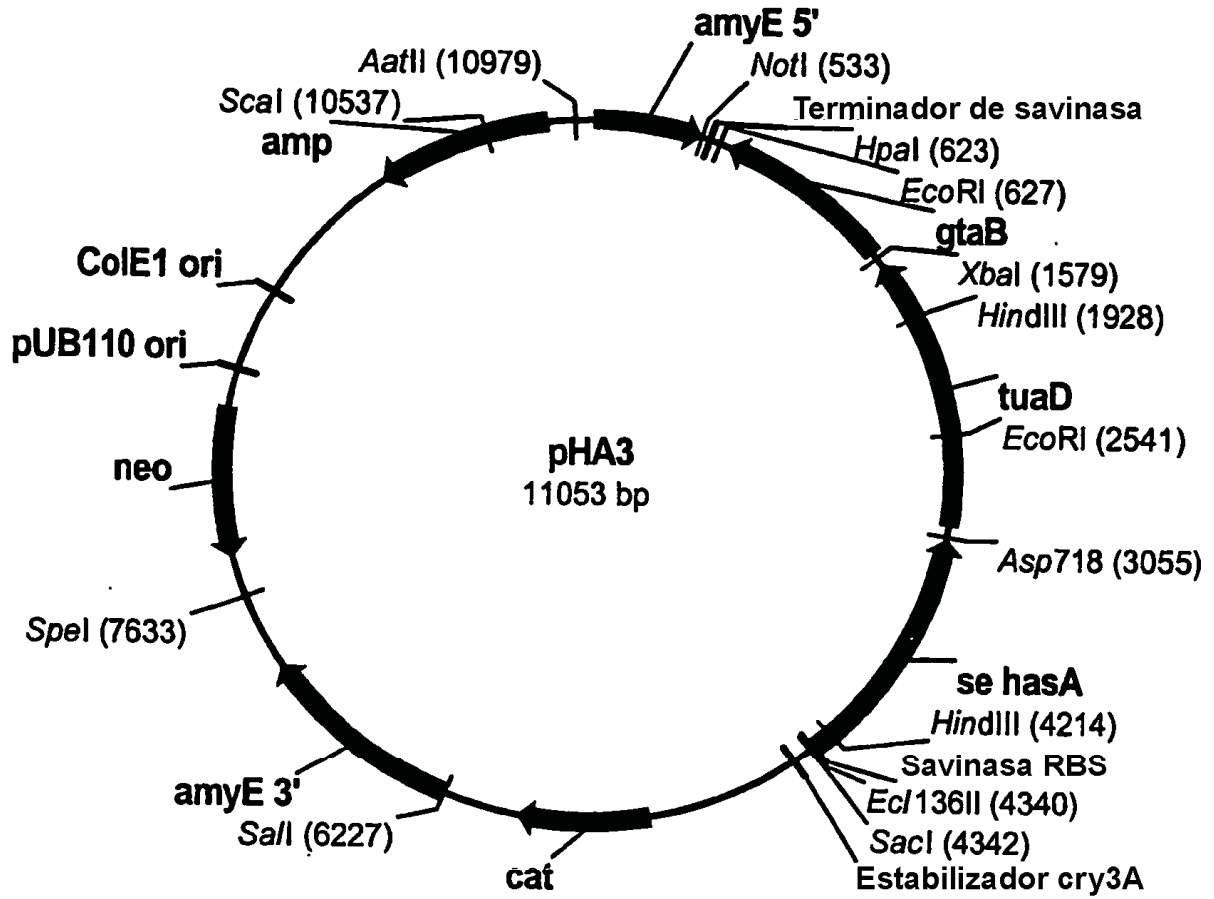


Fig. 9

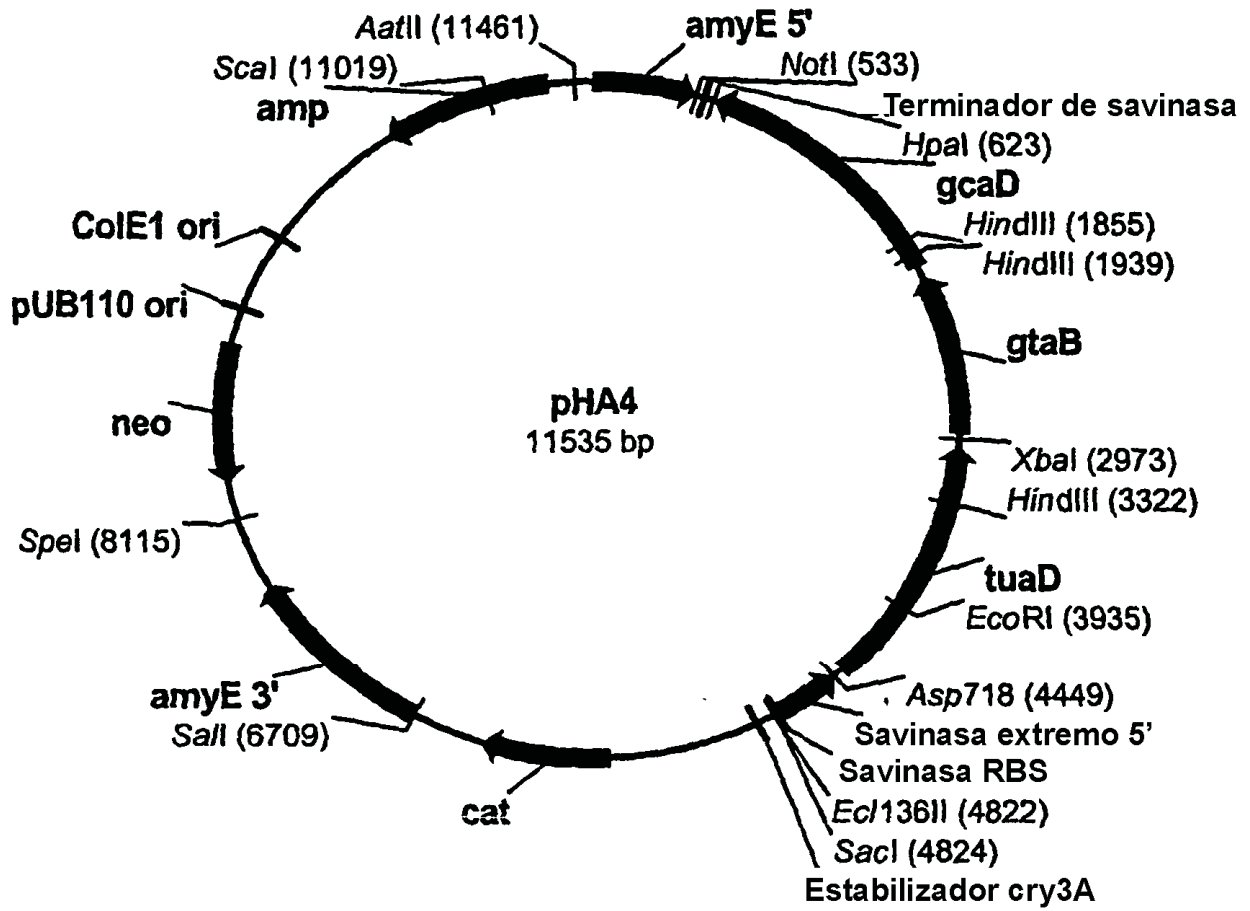


Fig. 10

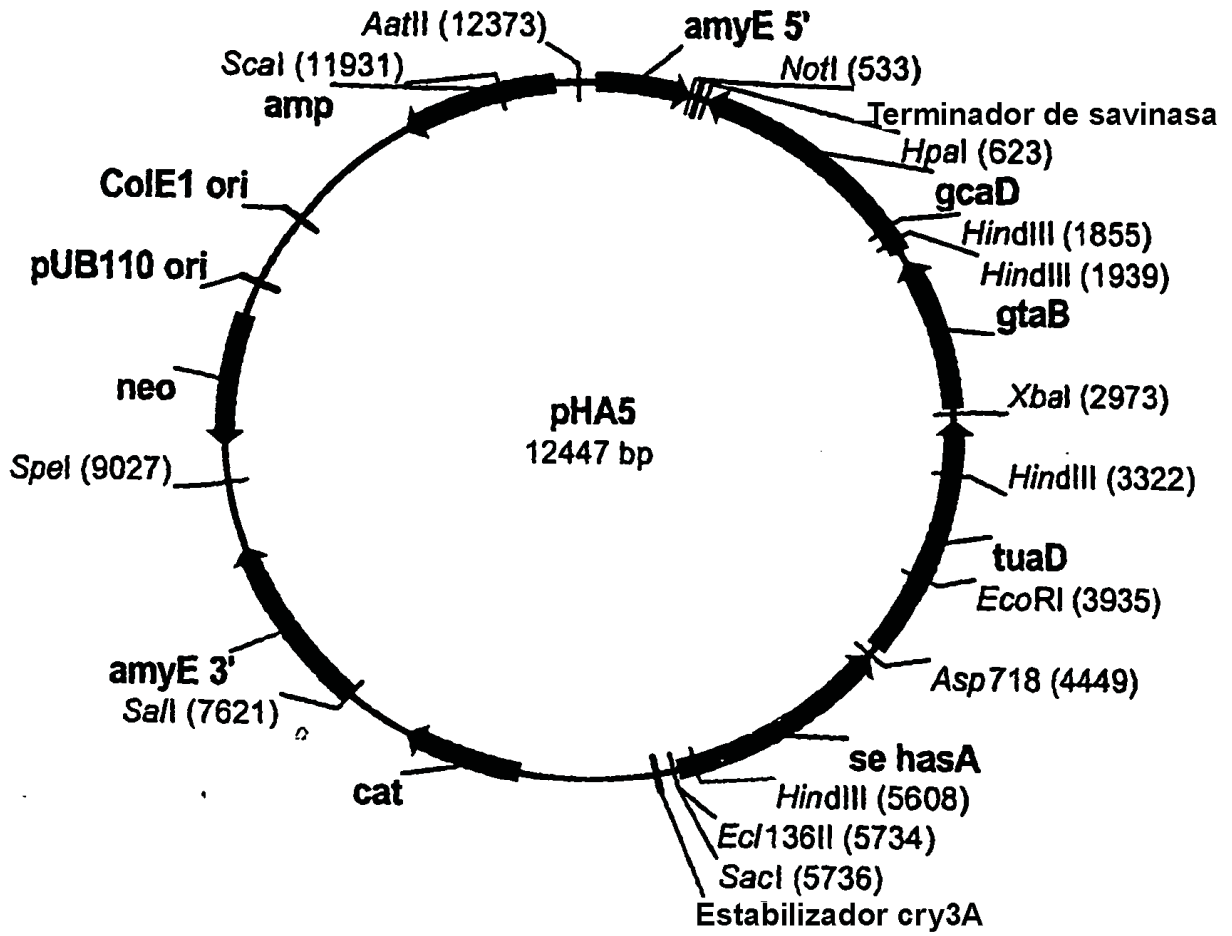


Fig. 11

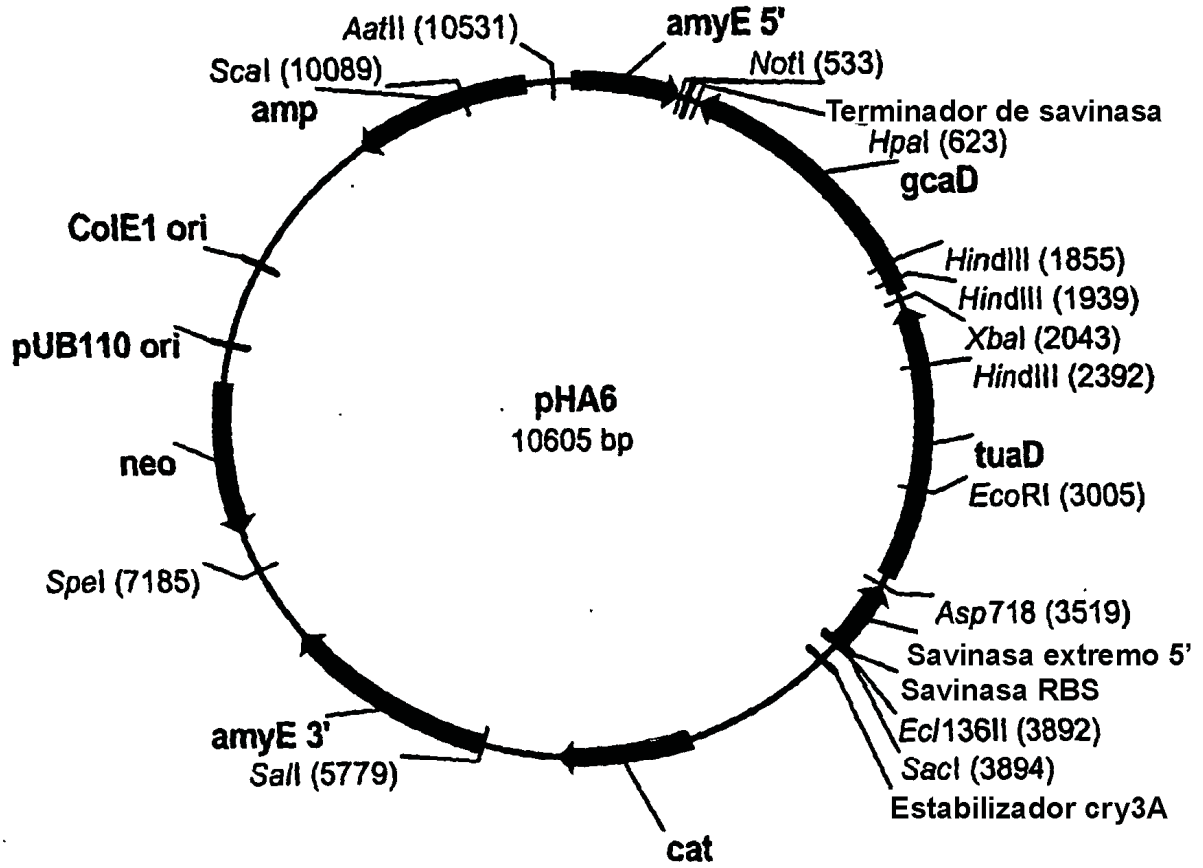


Fig. 12

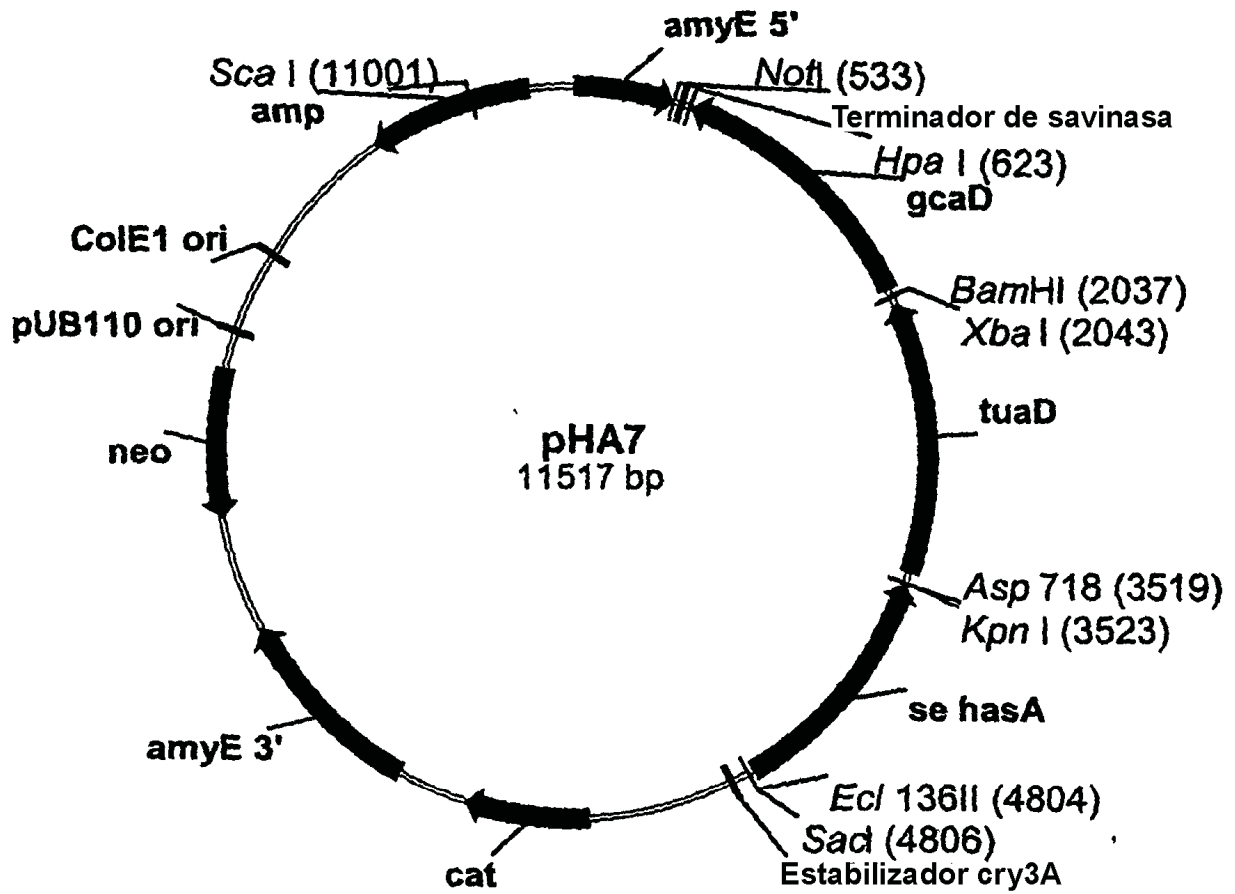


Fig. 13

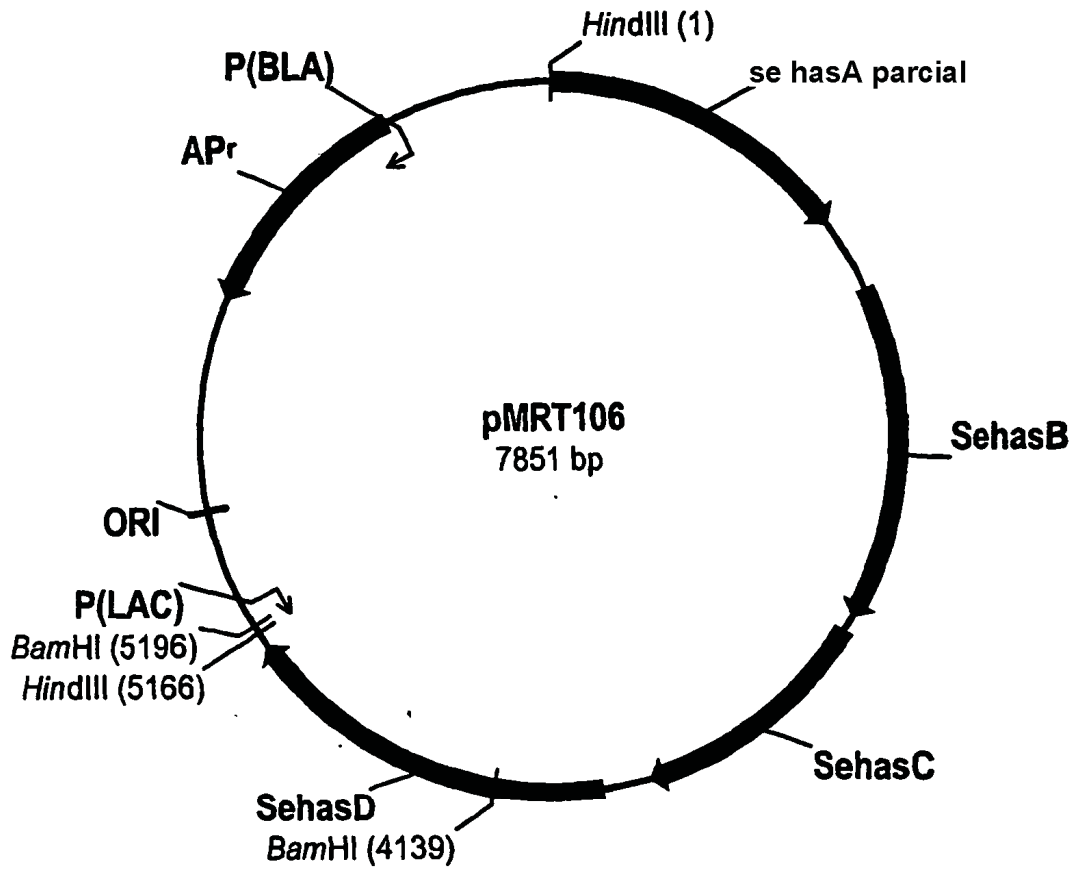


Fig. 14

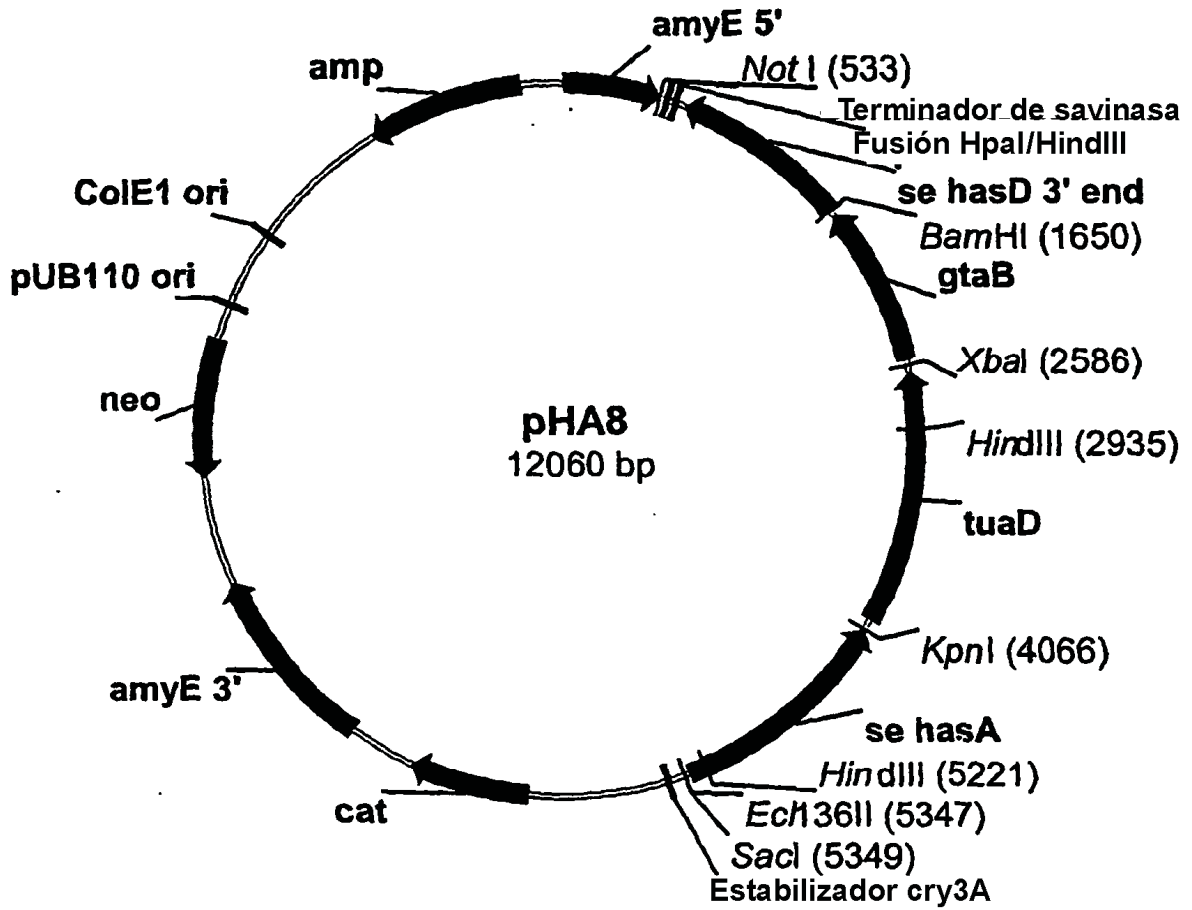


Fig. 15

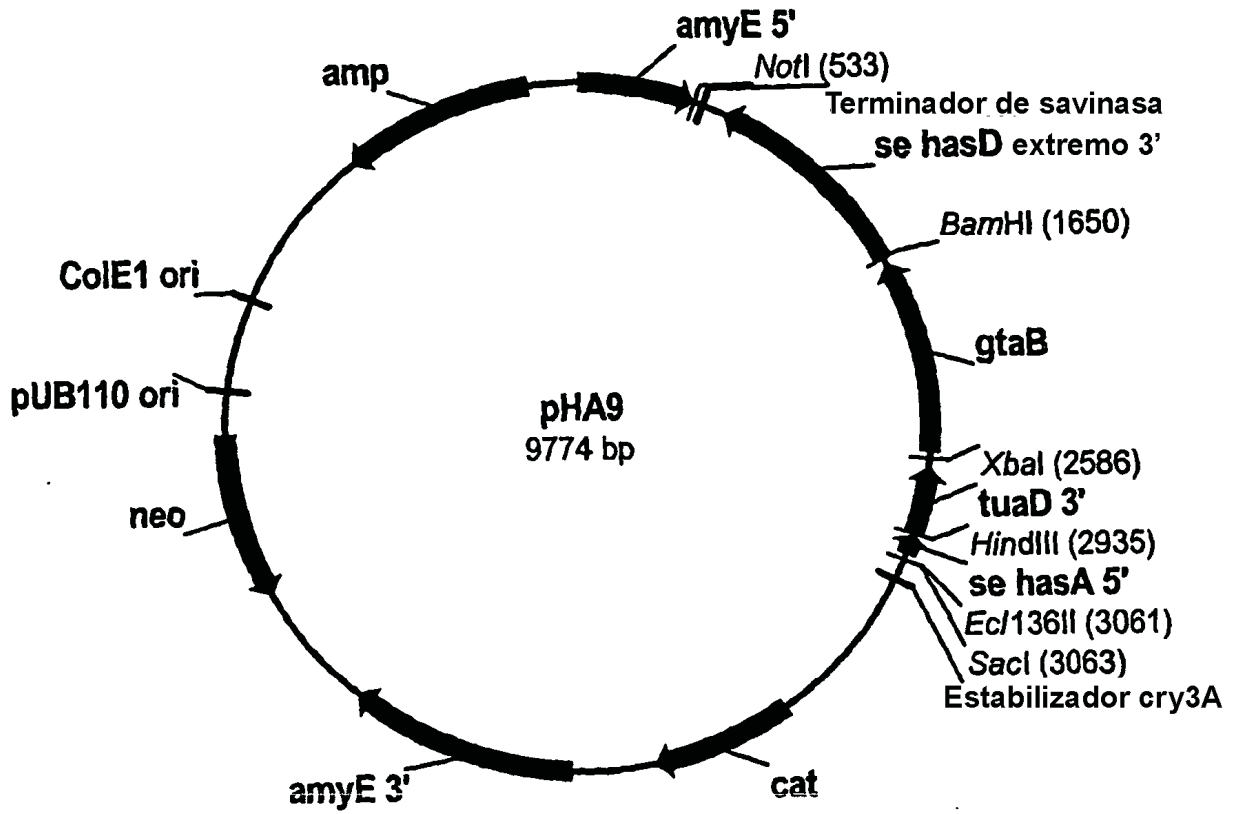


Fig. 16

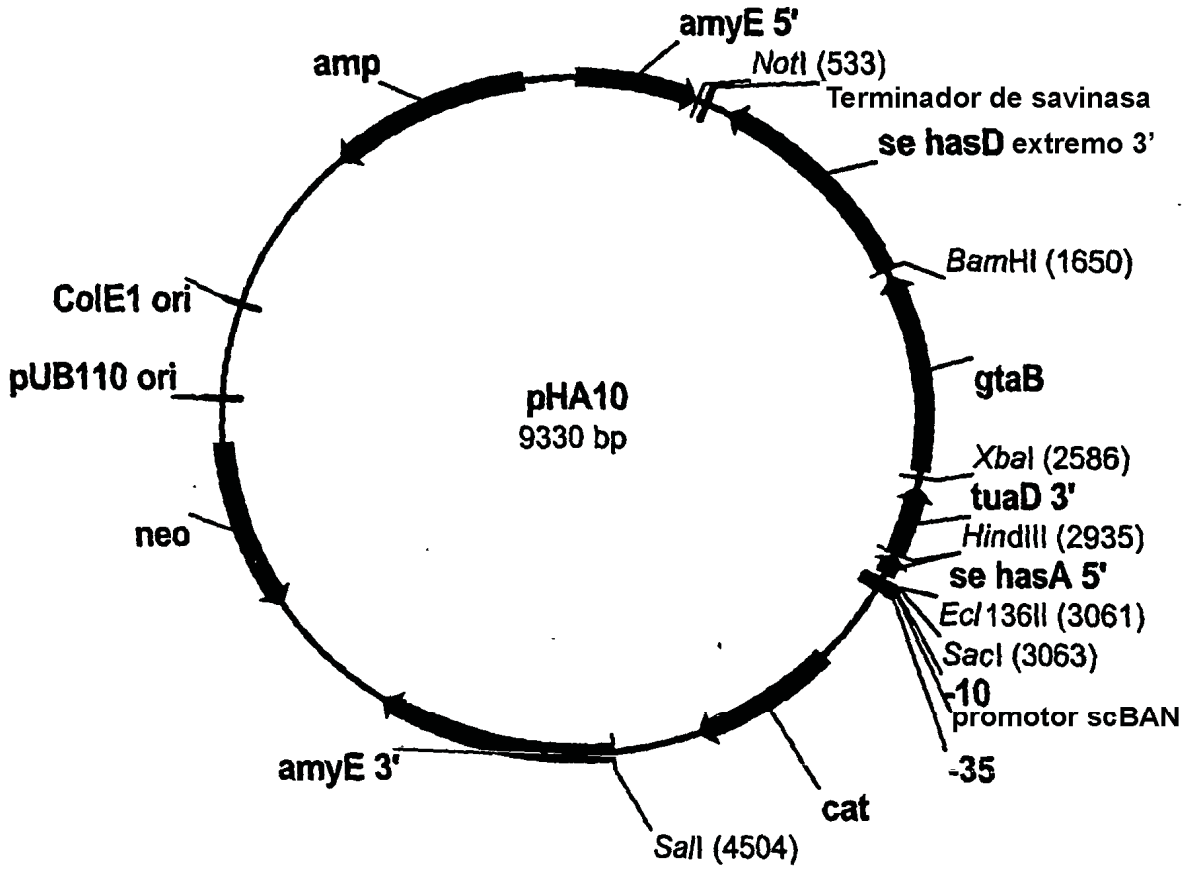


Fig. 17

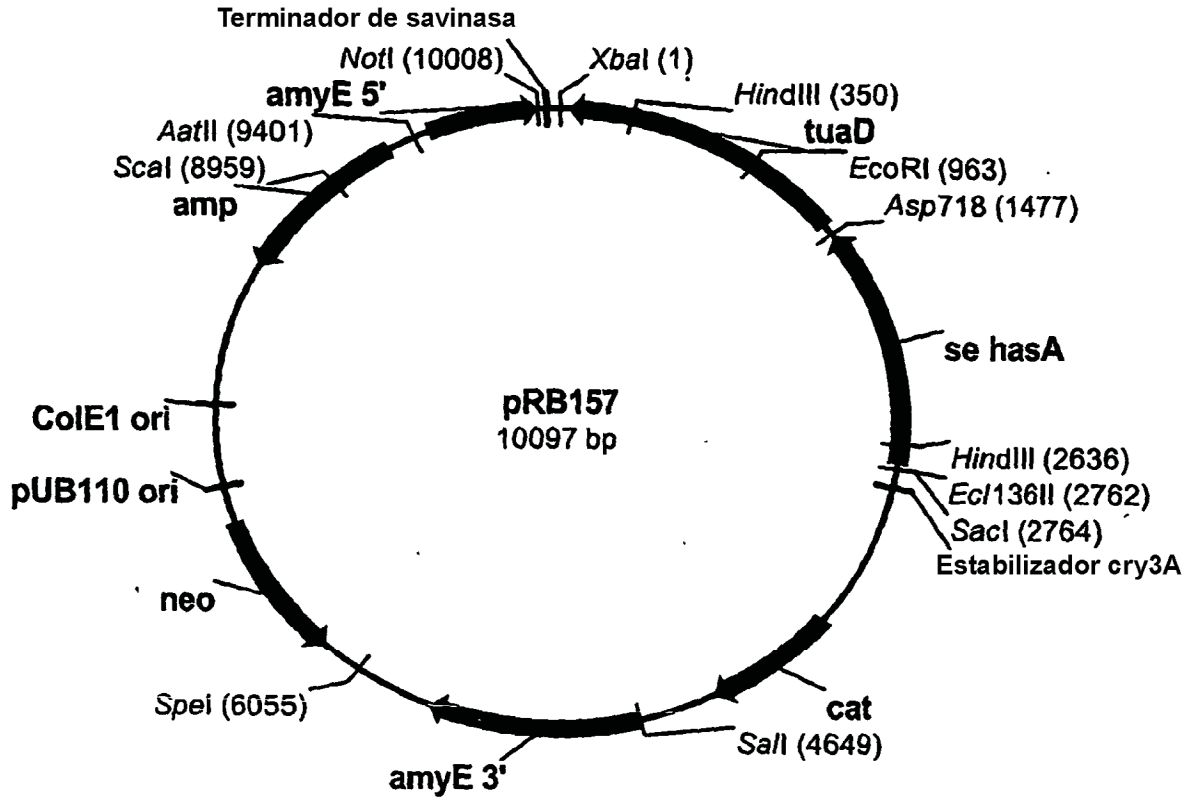


Fig. 18

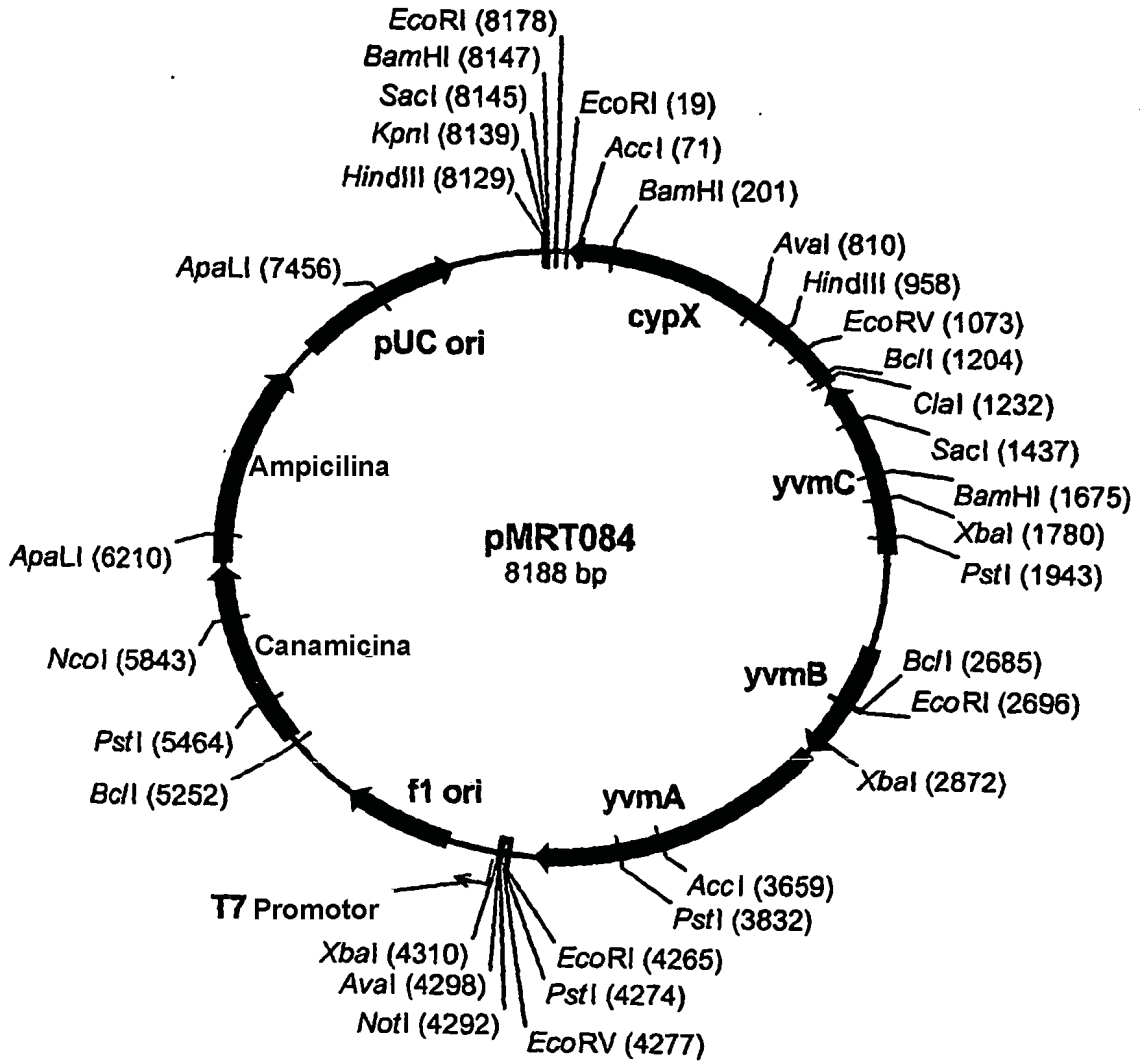


Fig. 19

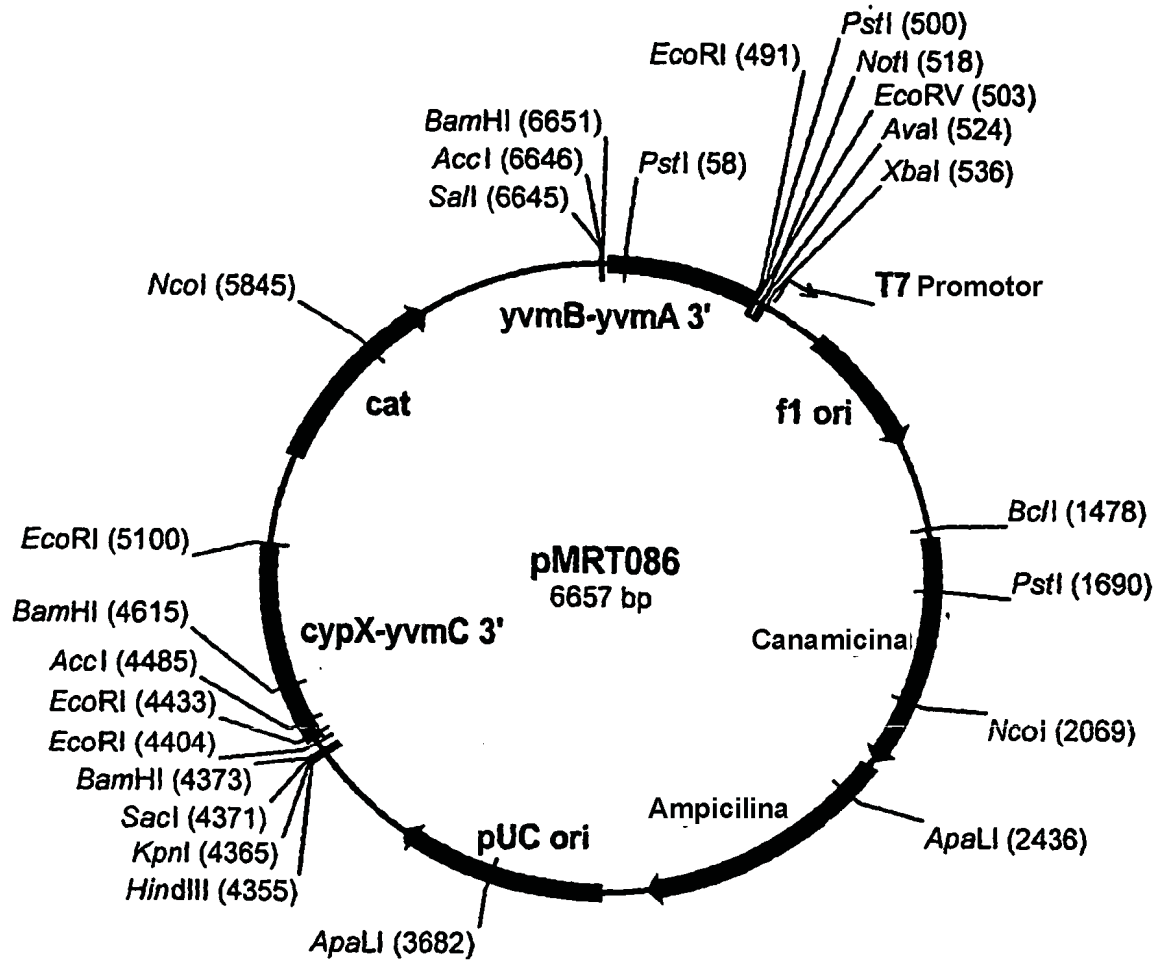


Fig. 20

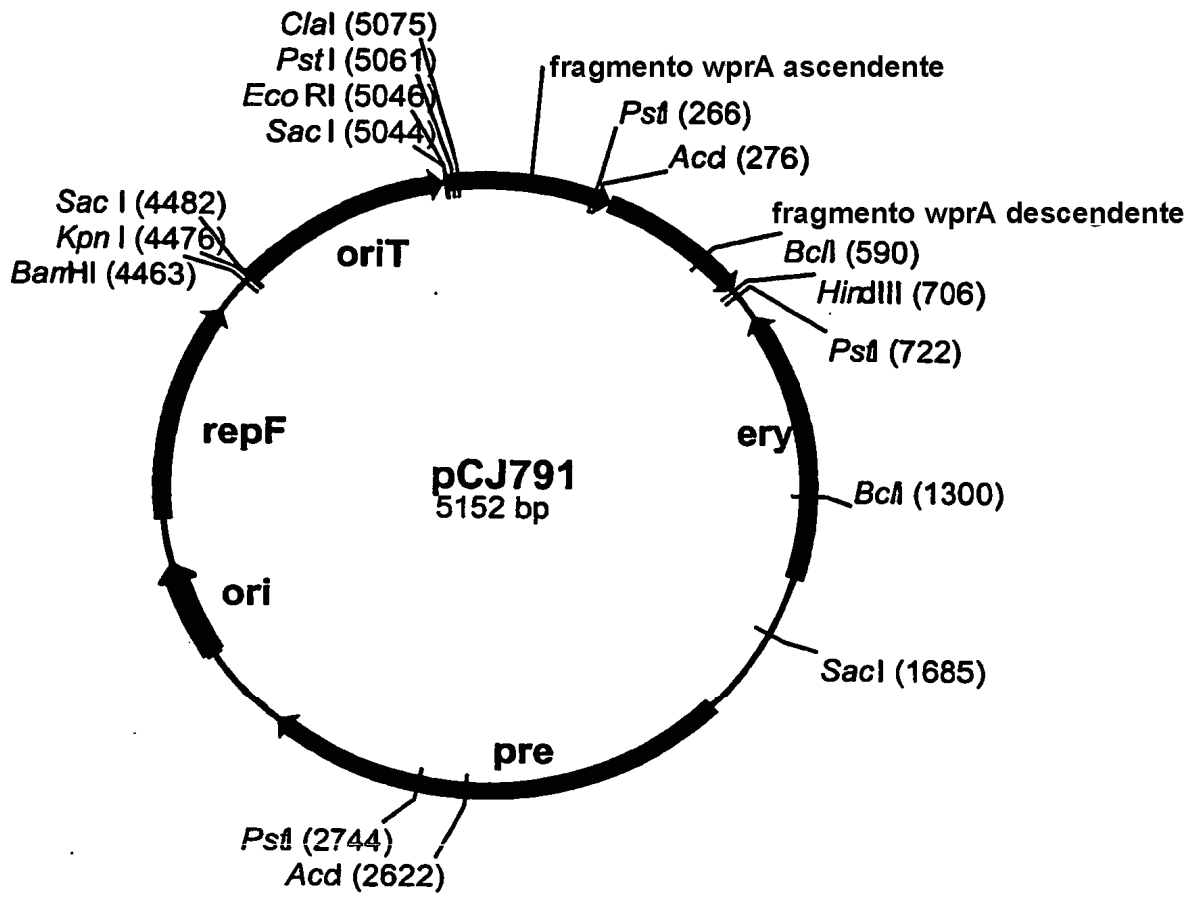


Fig. 21

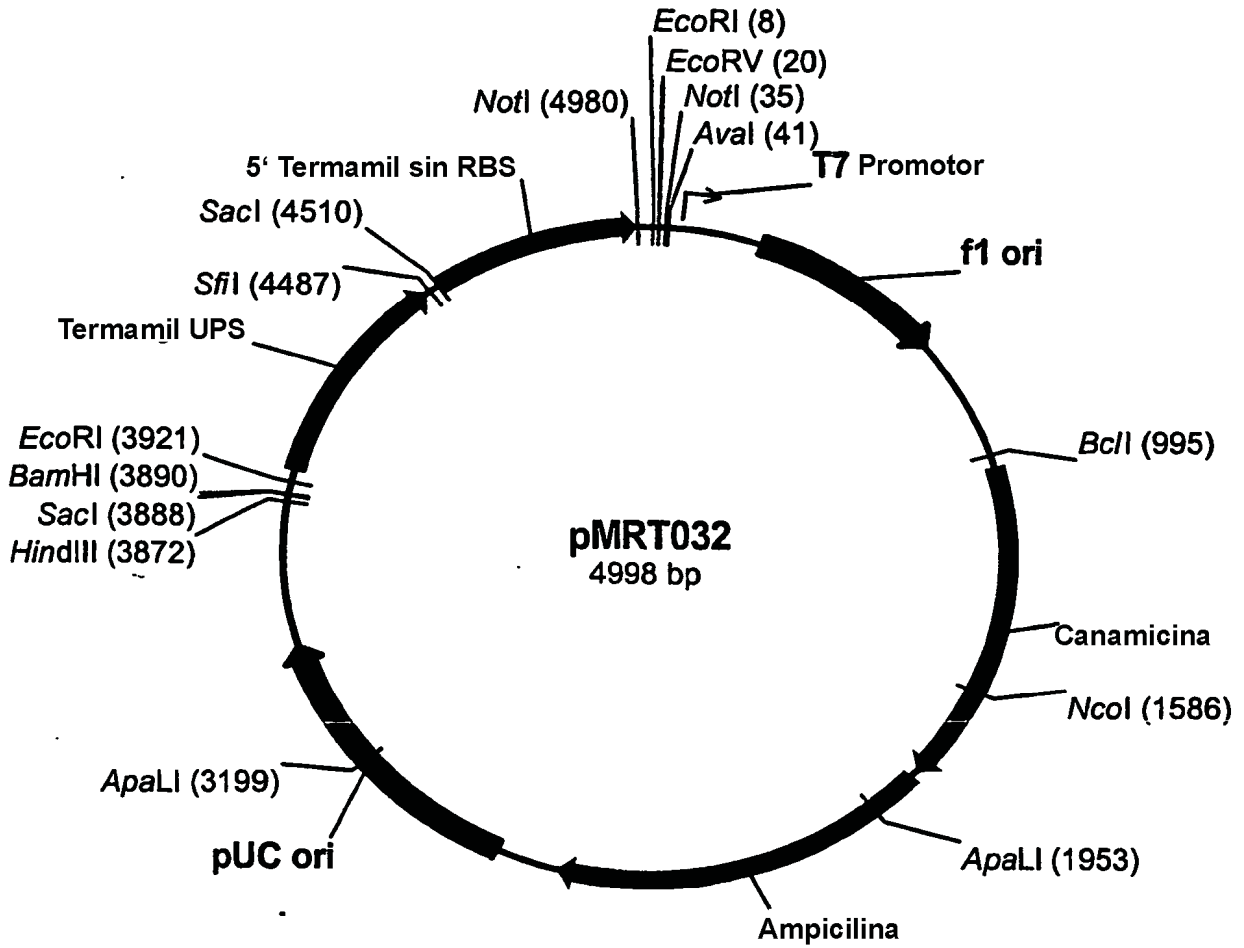


Fig. 22

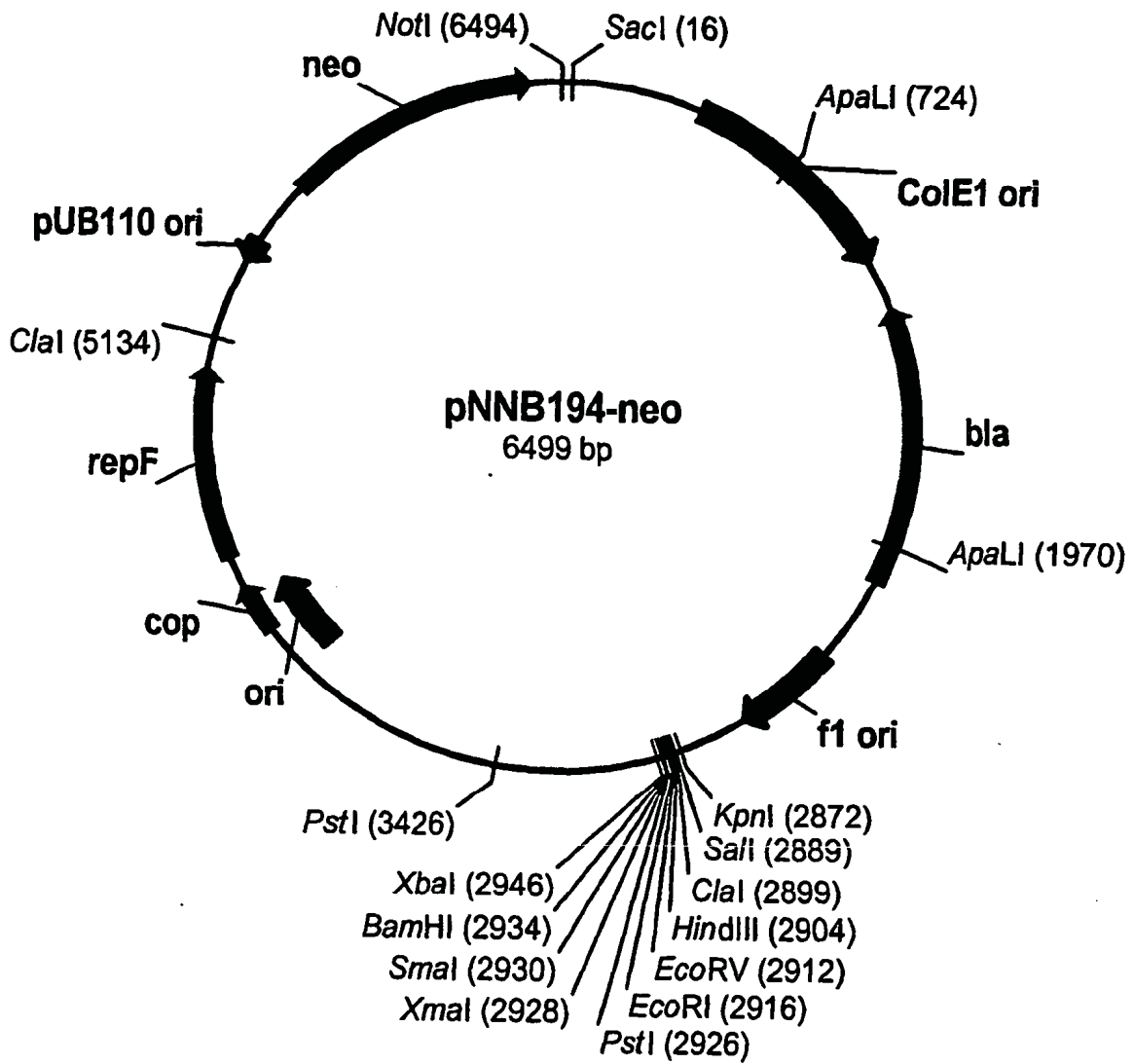


Fig. 23

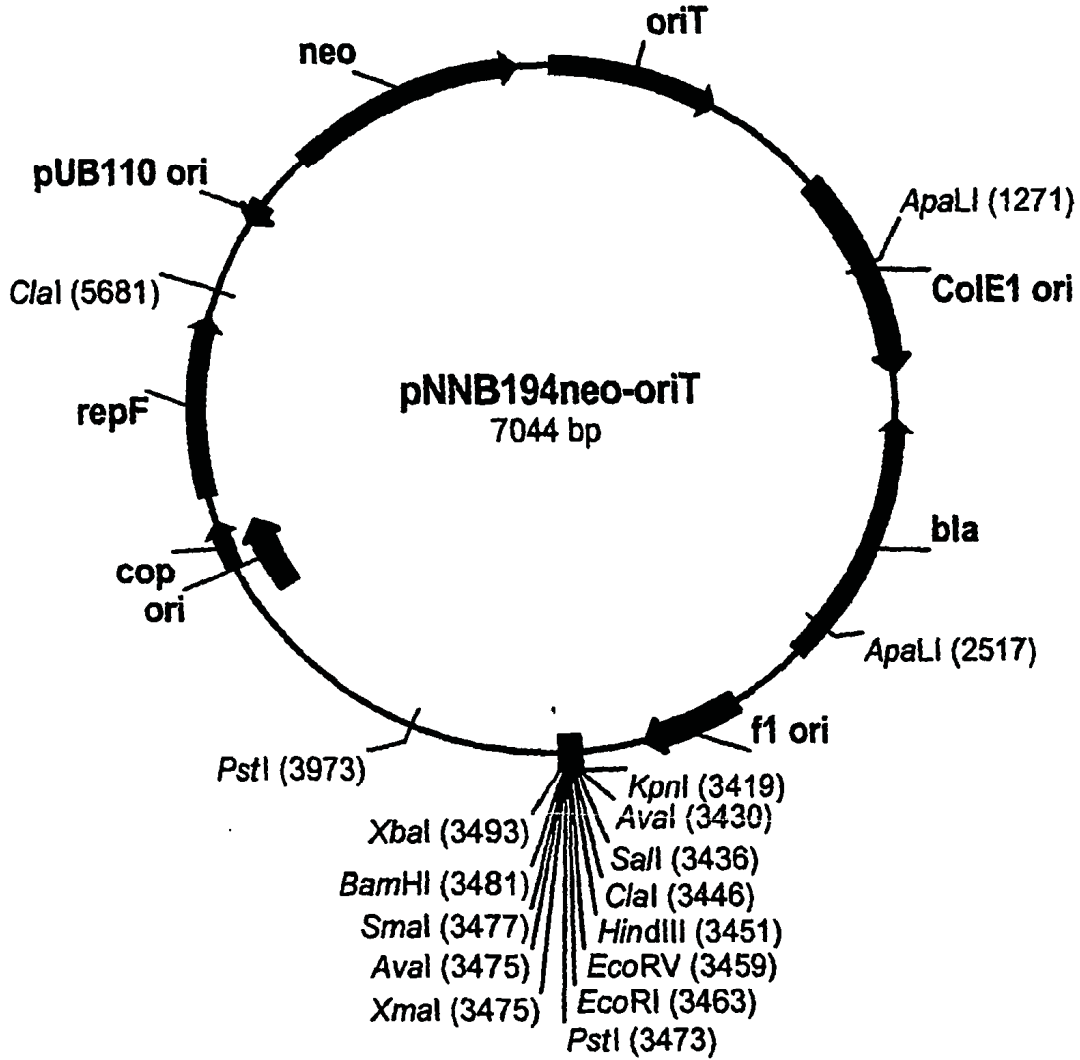


Fig. 24

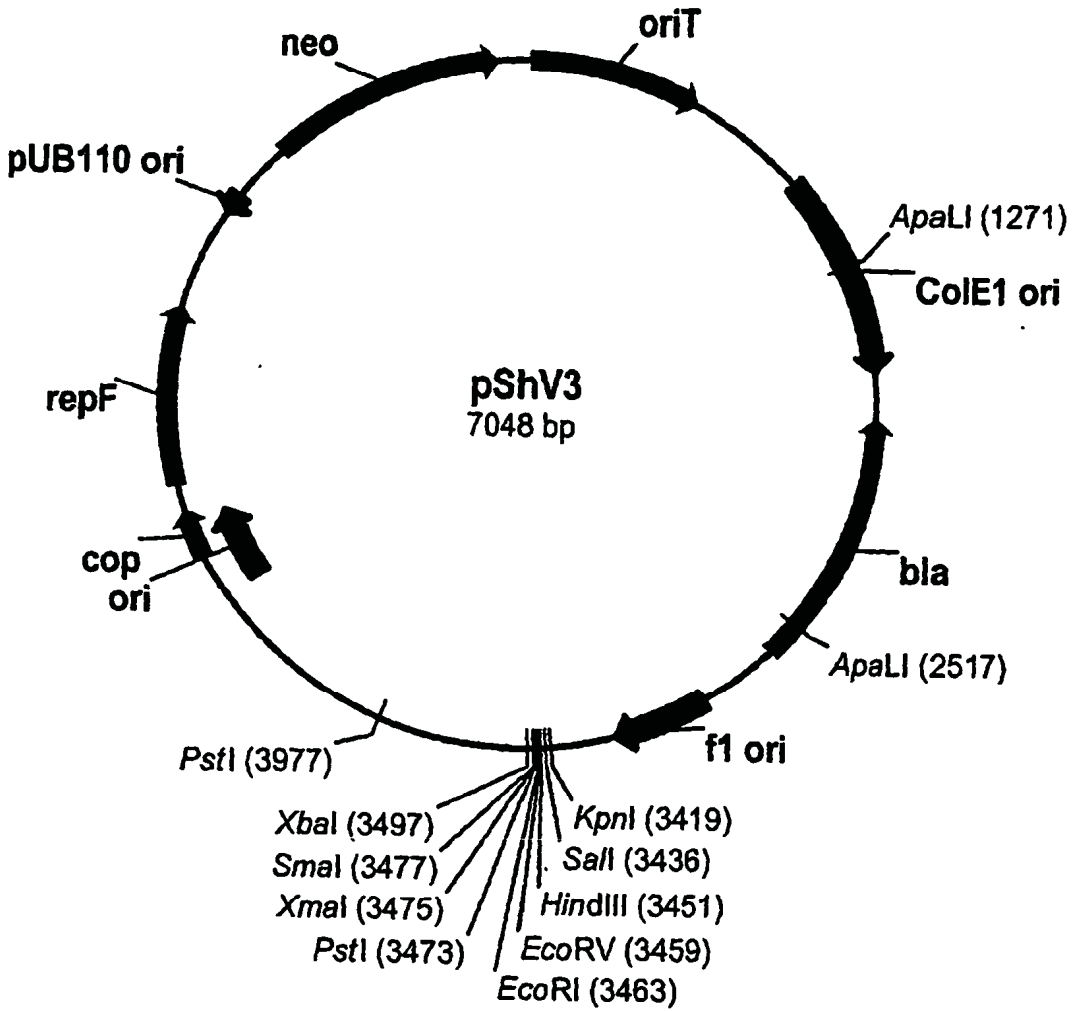


Fig. 25

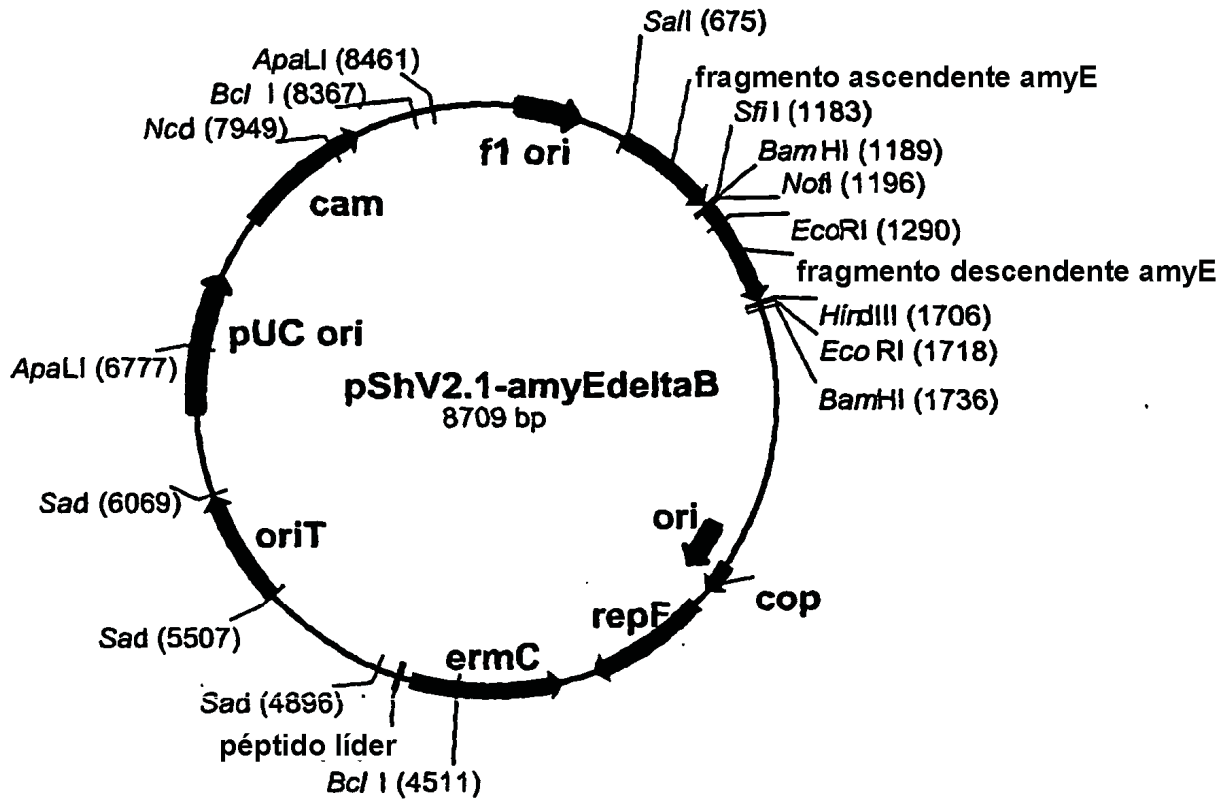


Fig. 26

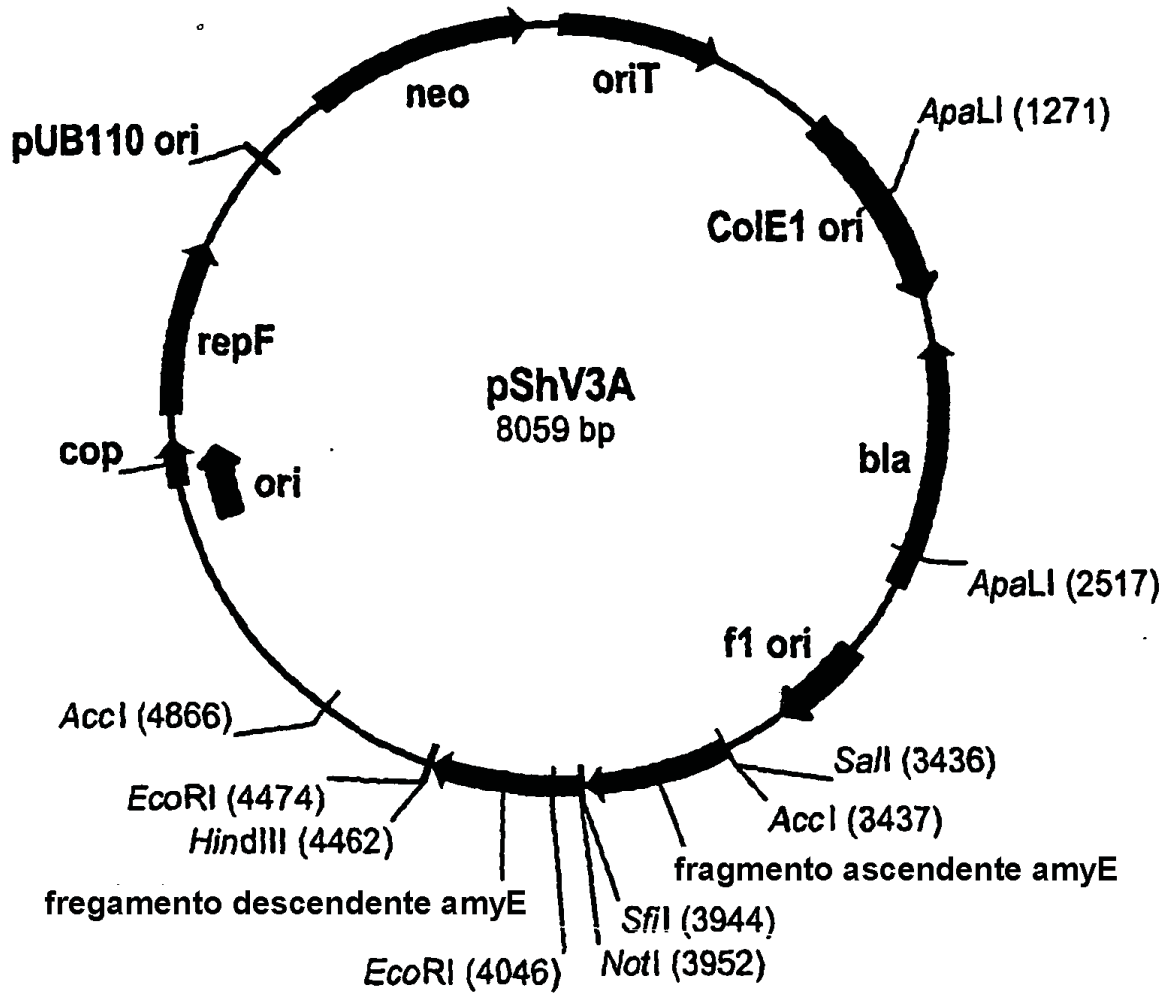


Fig. 27

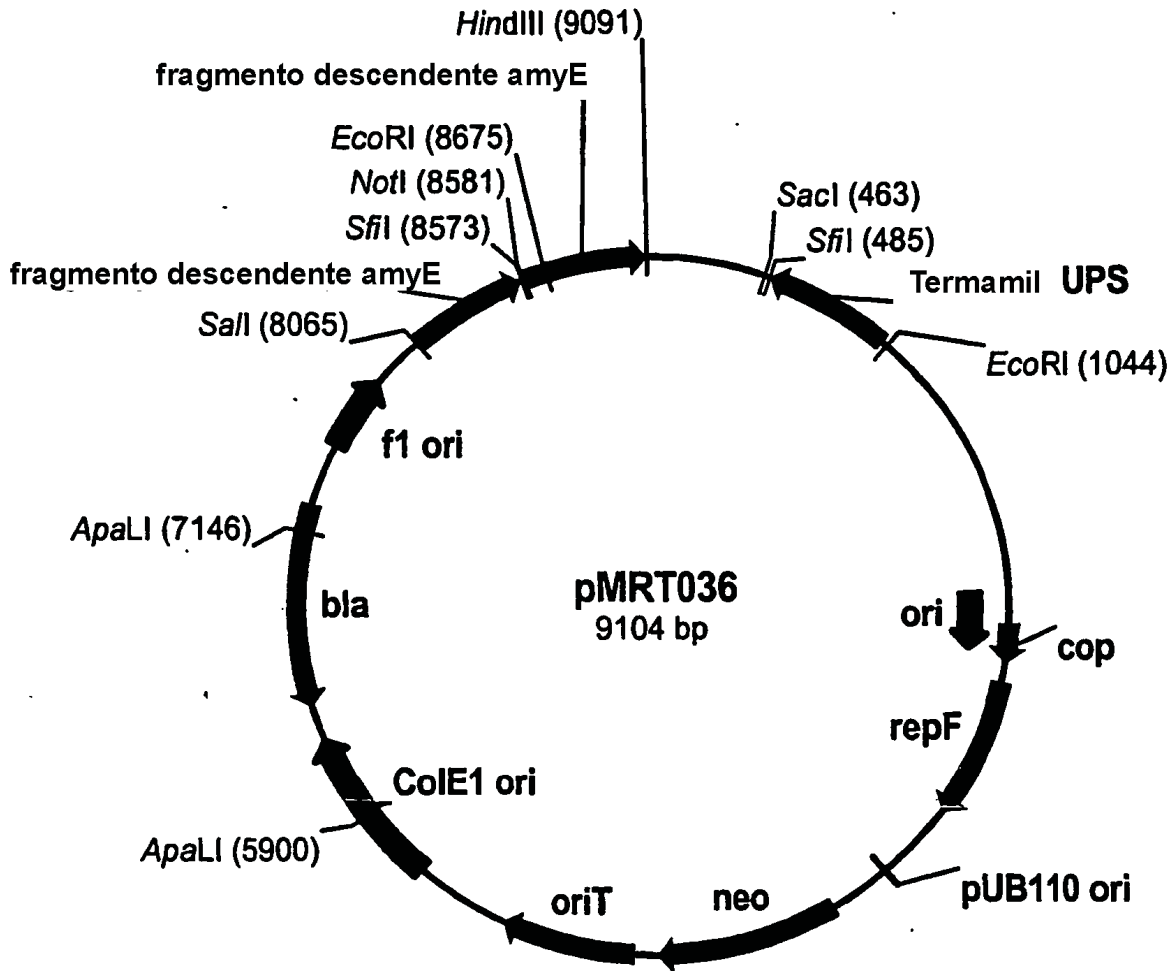


Fig. 28

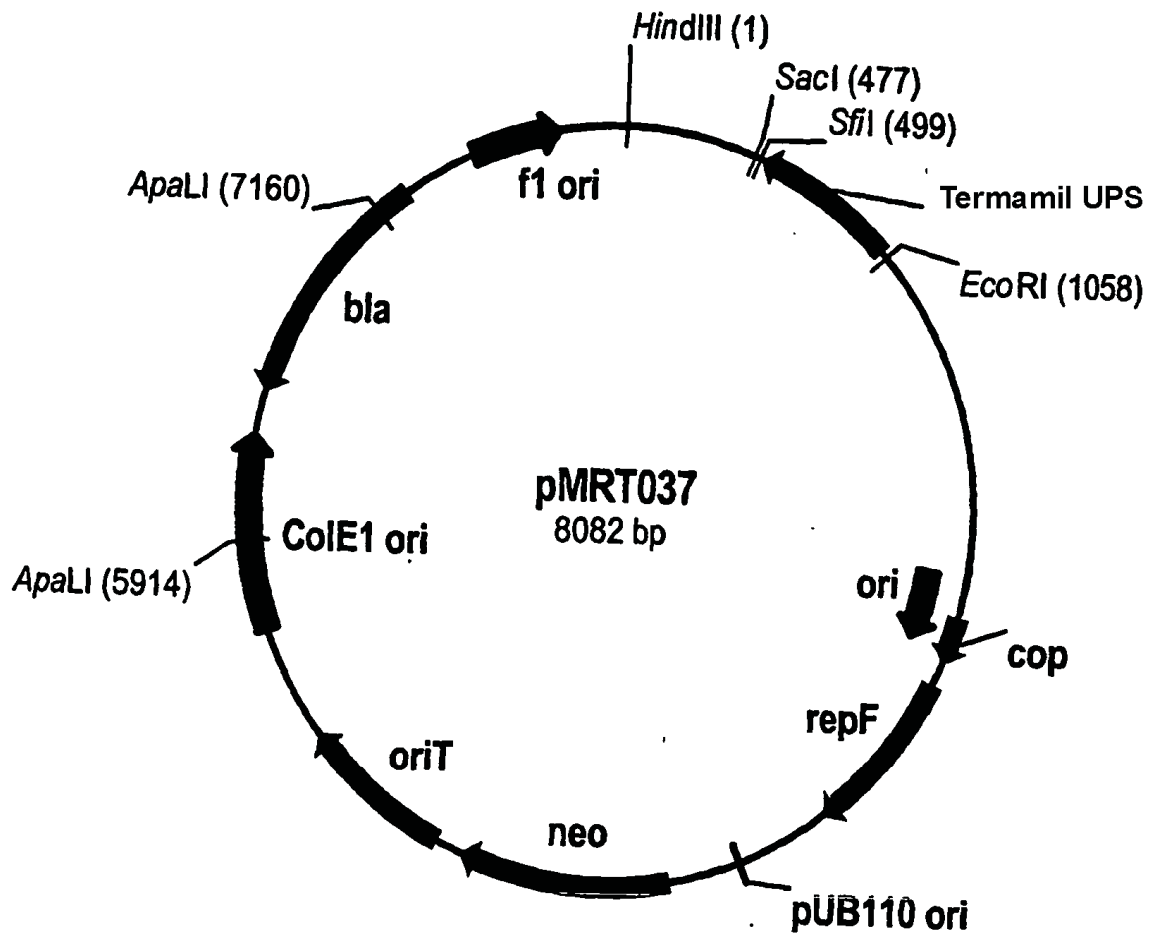


Fig. 29

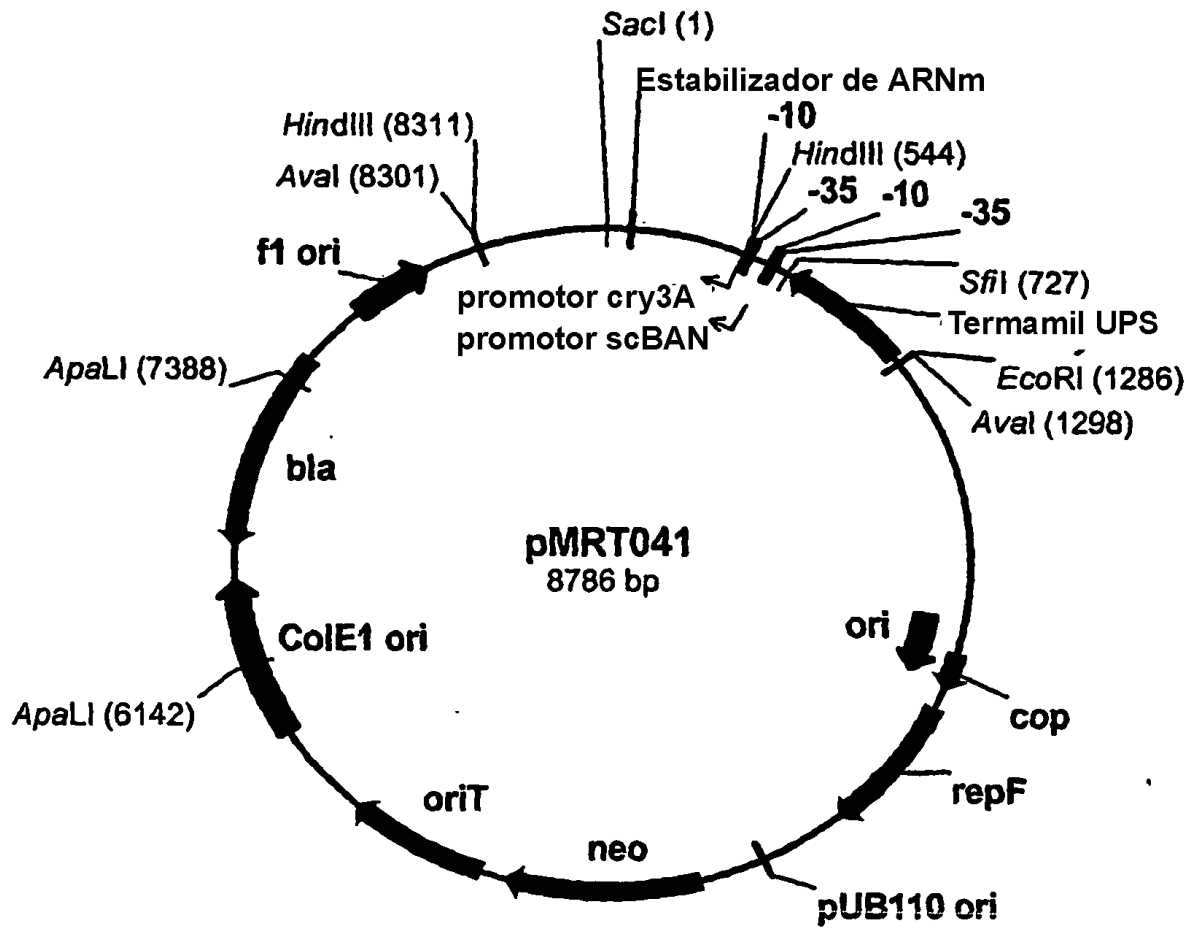


Fig. 30

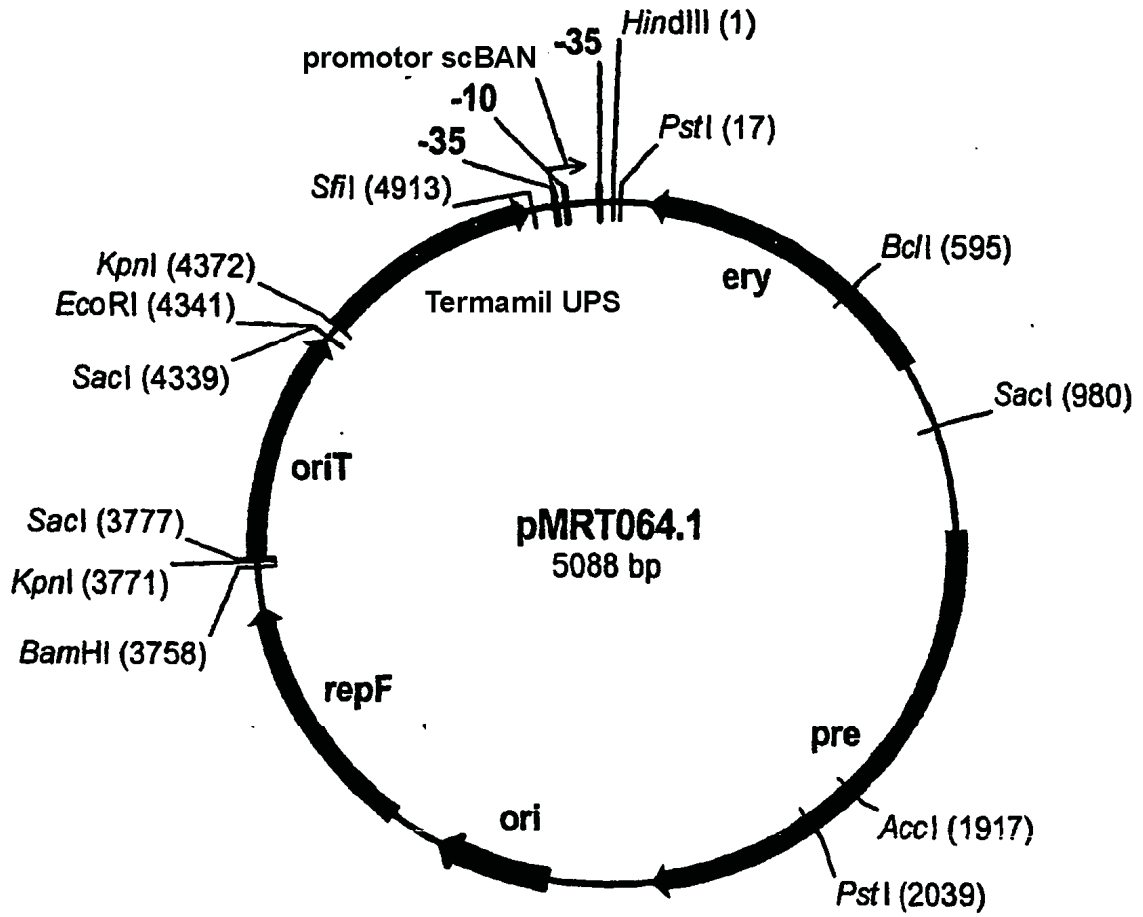


Fig. 31

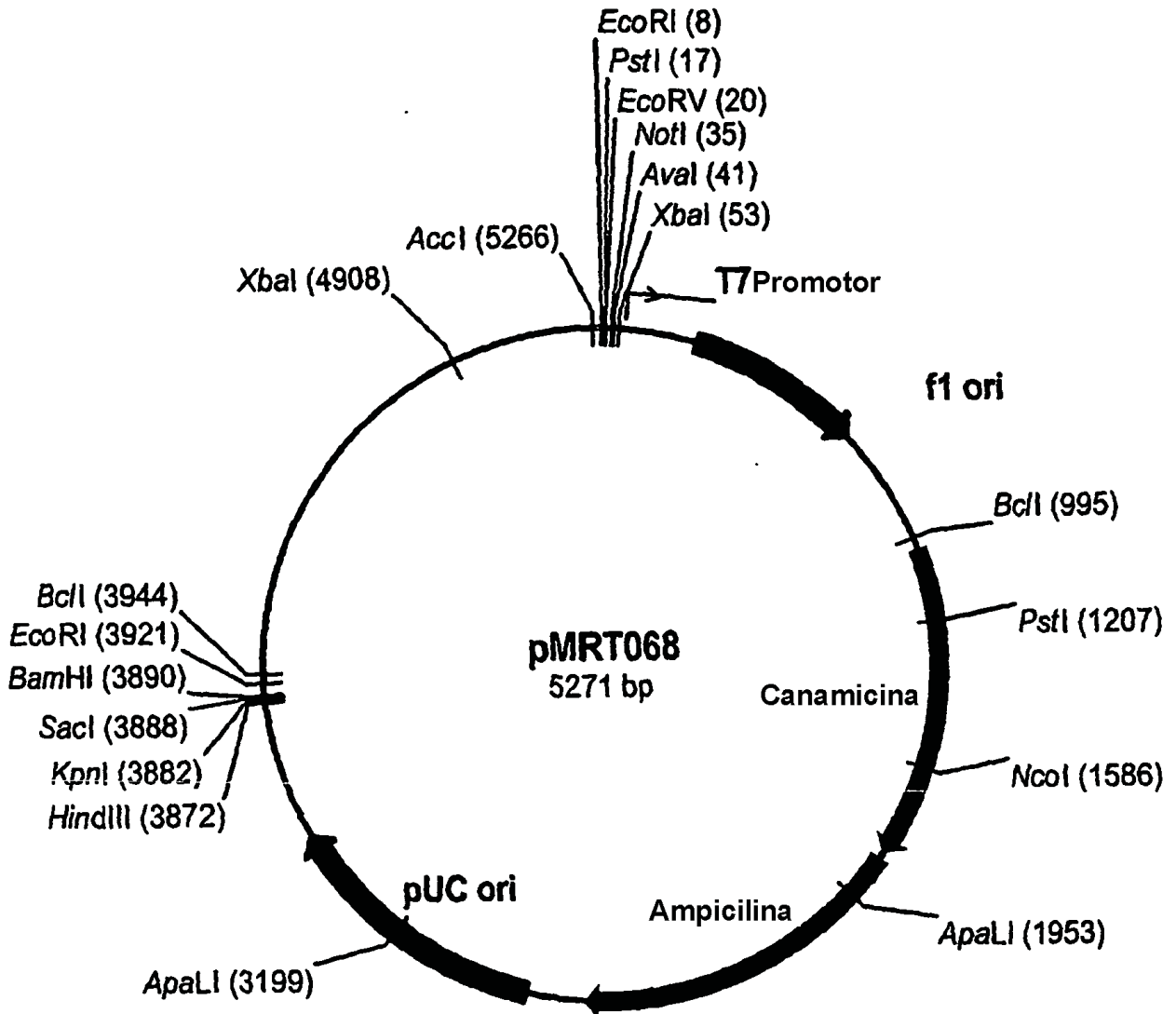


Fig. 32

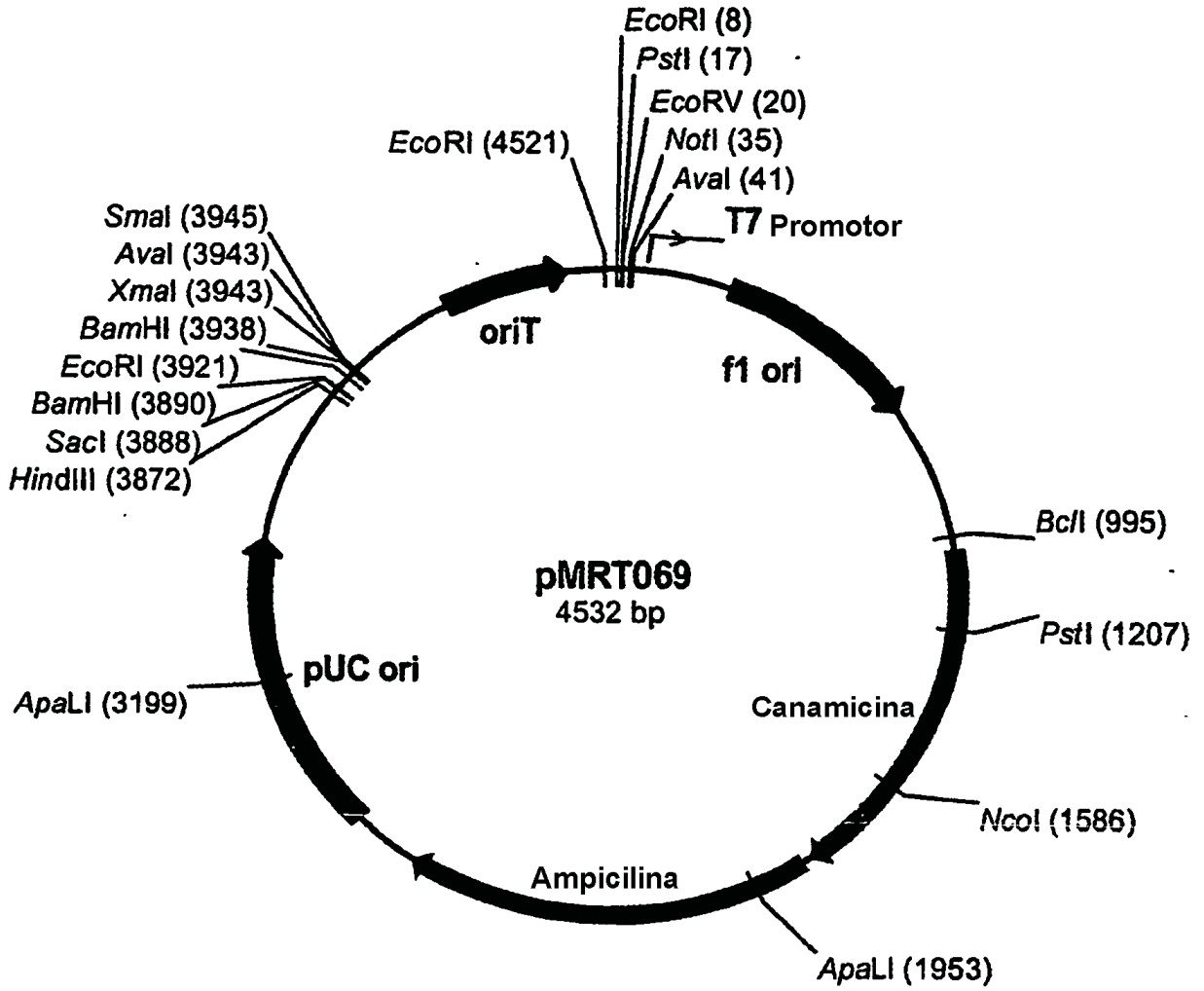


Fig. 33

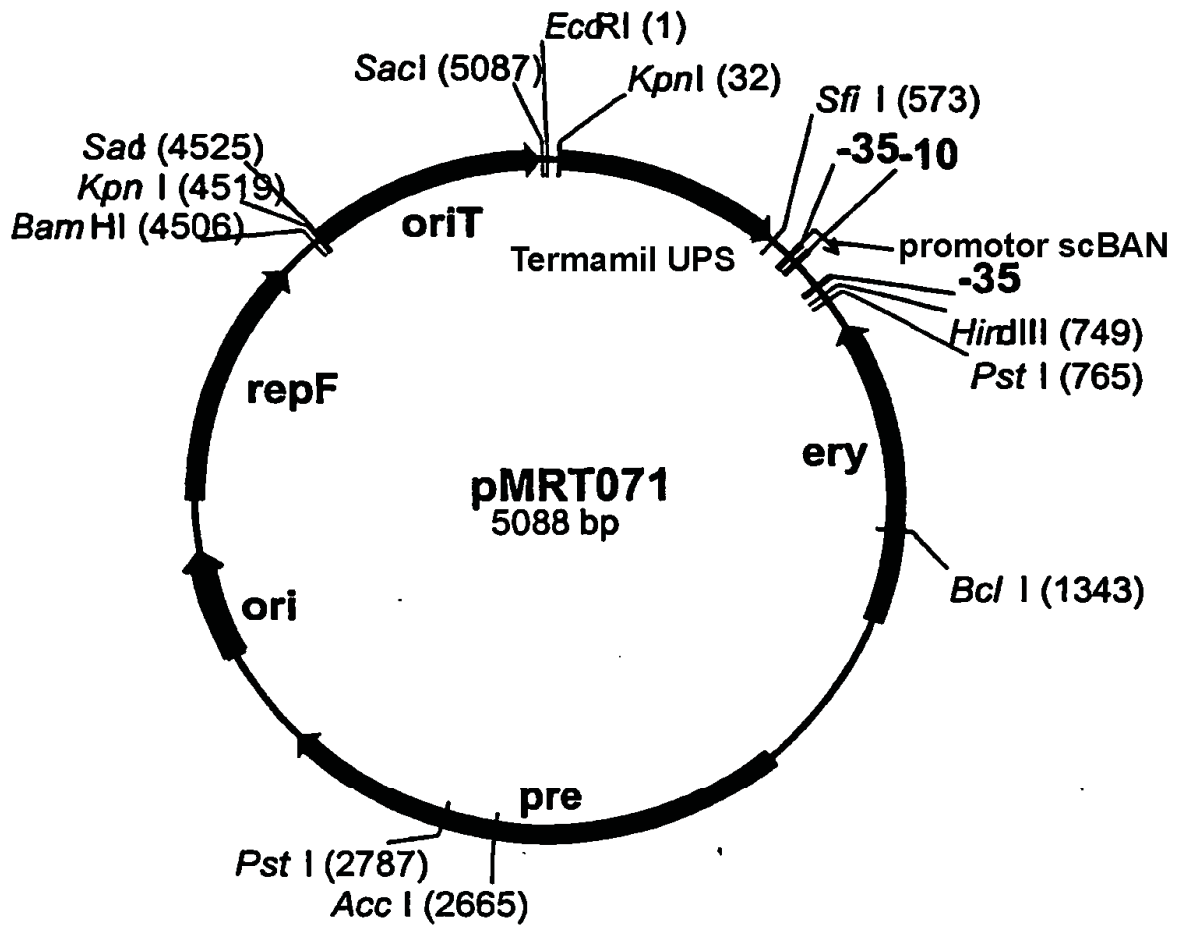


Fig. 34

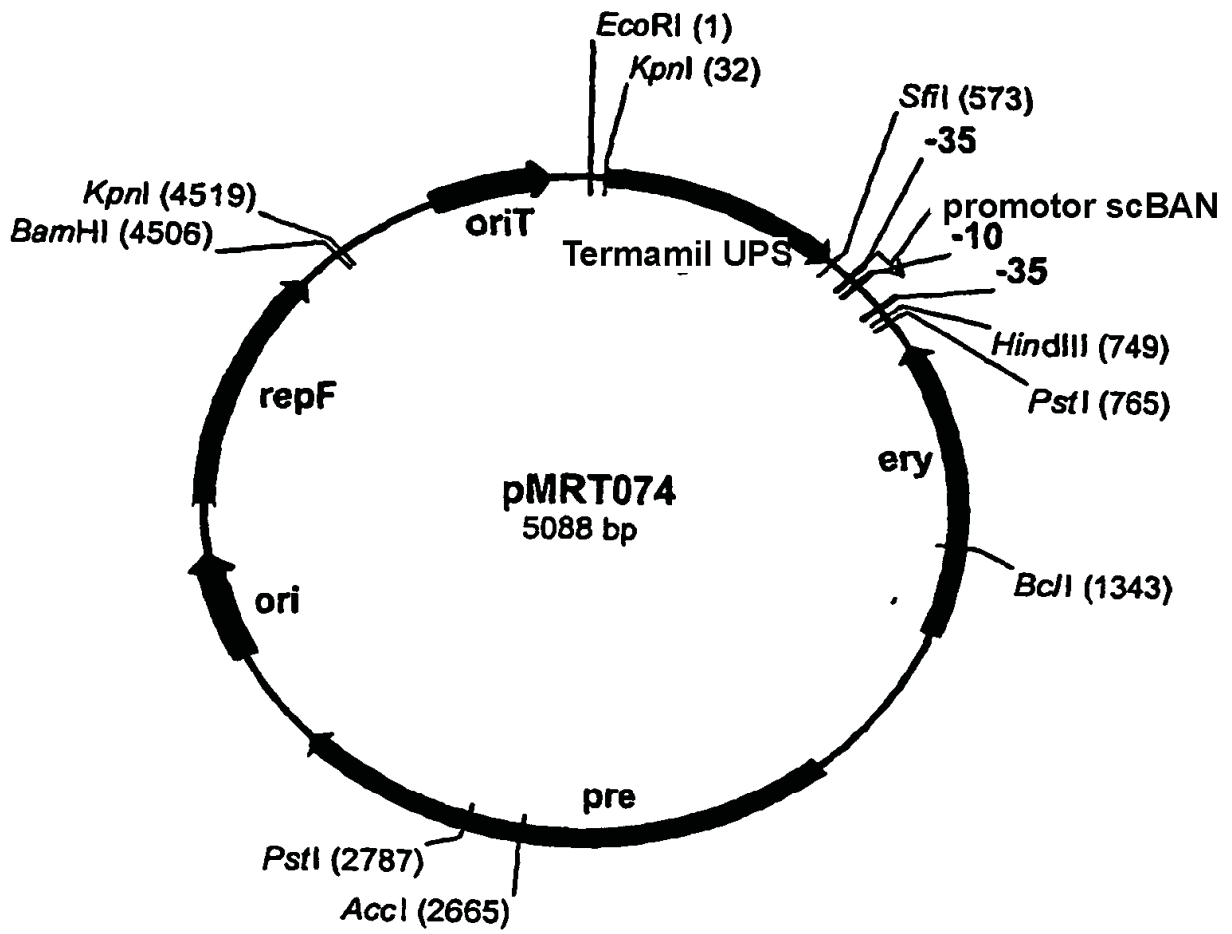


Fig. 35

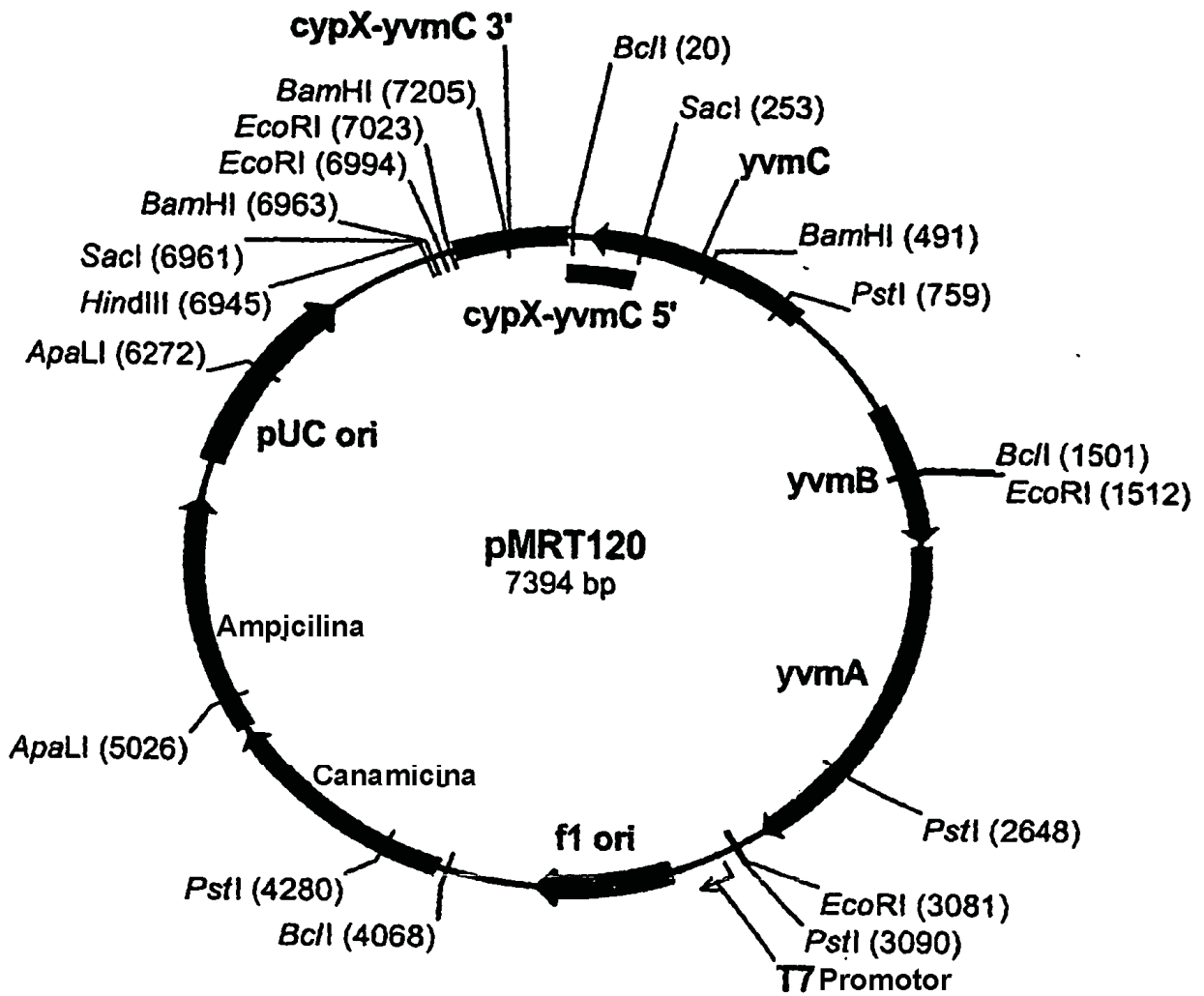


Fig. 36

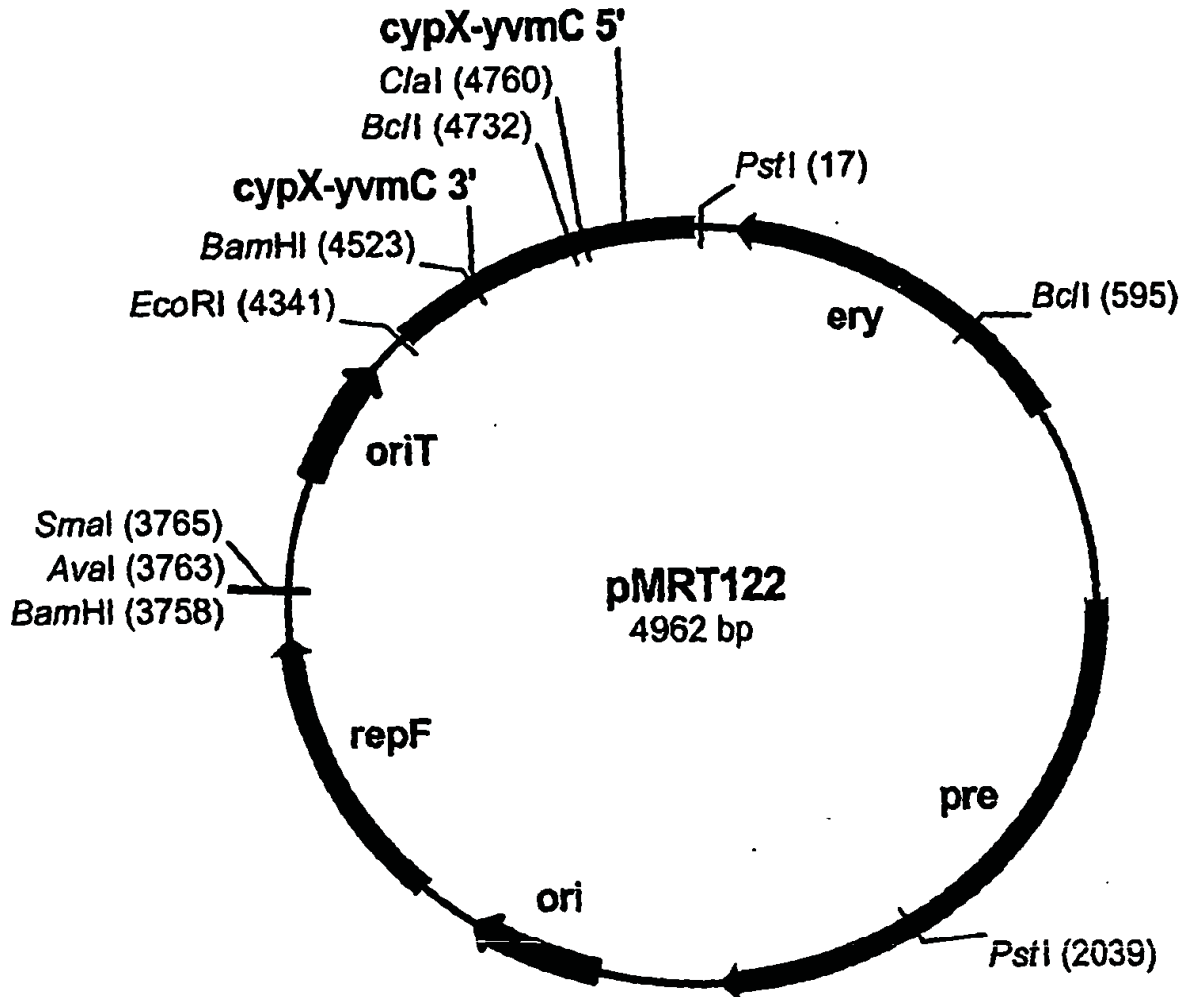


Fig. 37

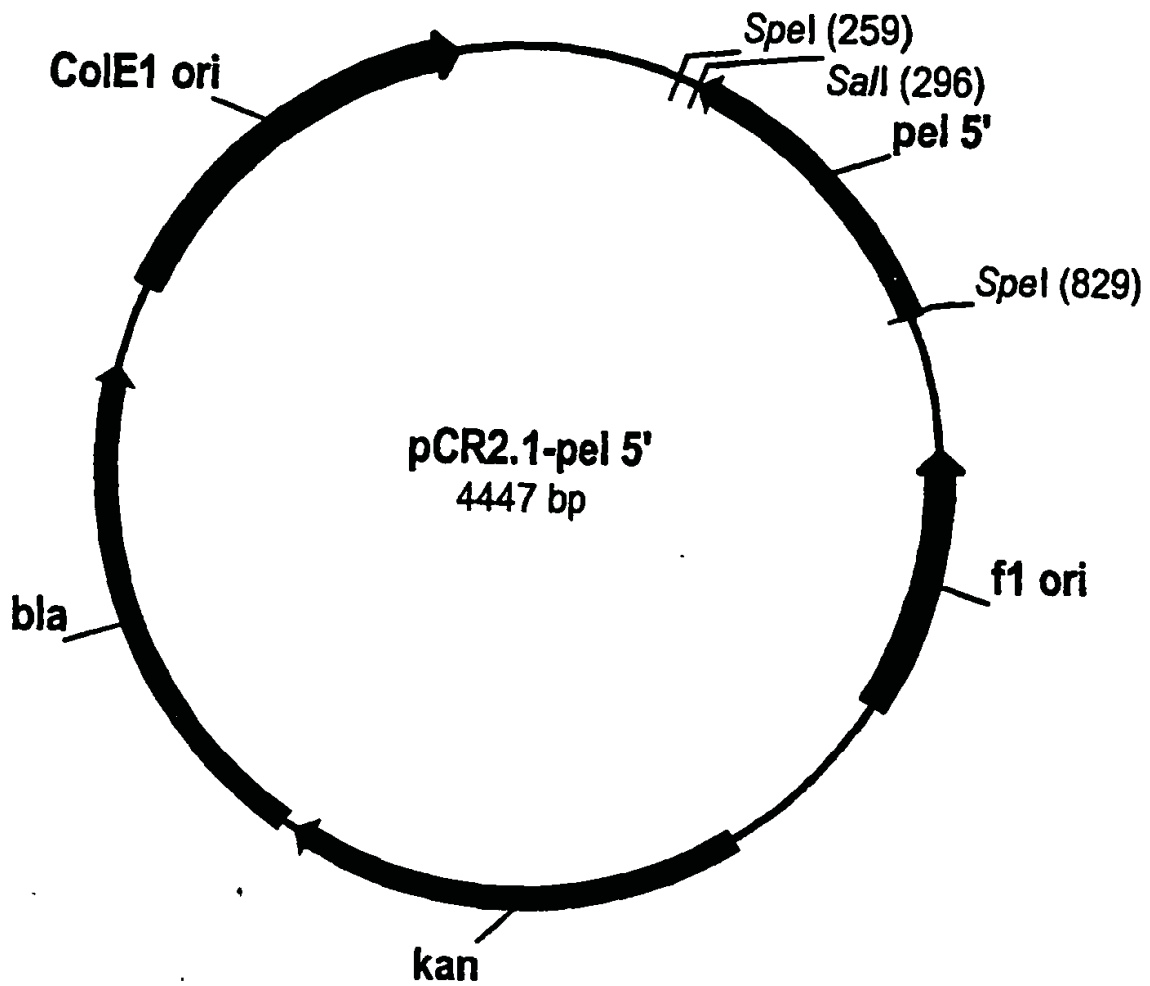


Fig. 38

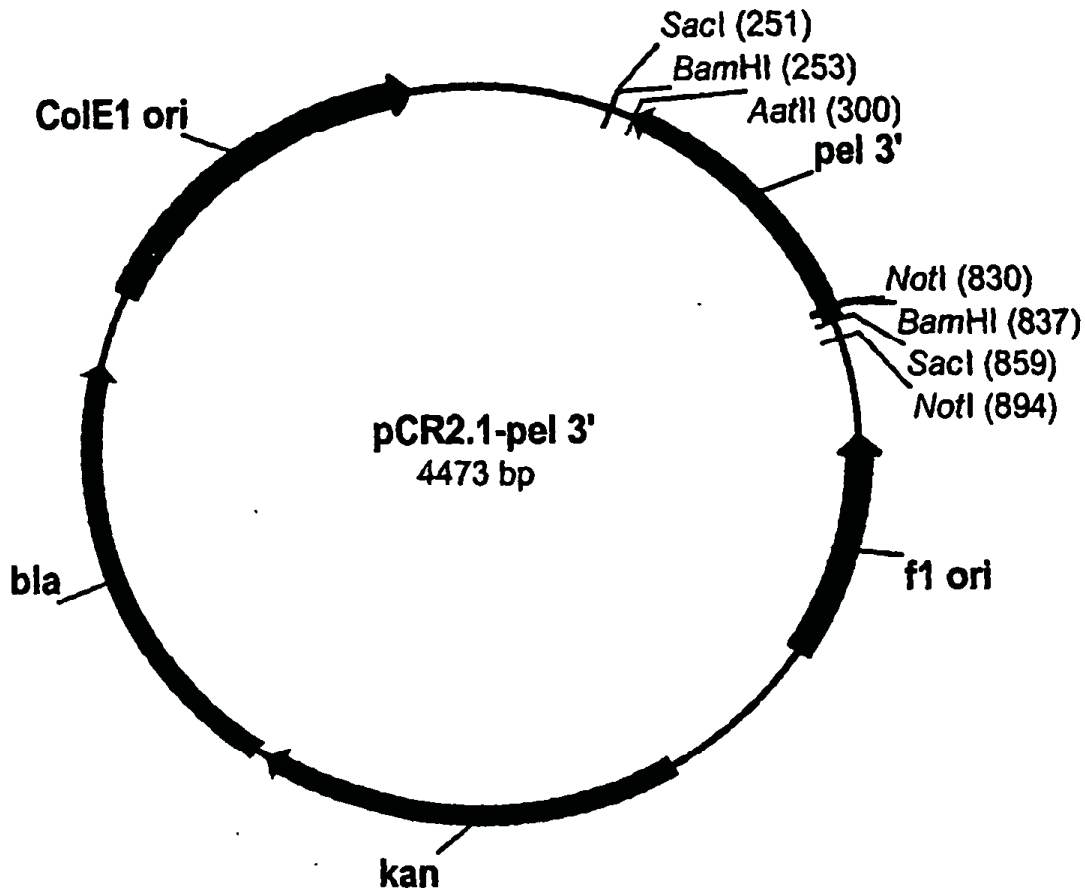


Fig. 39

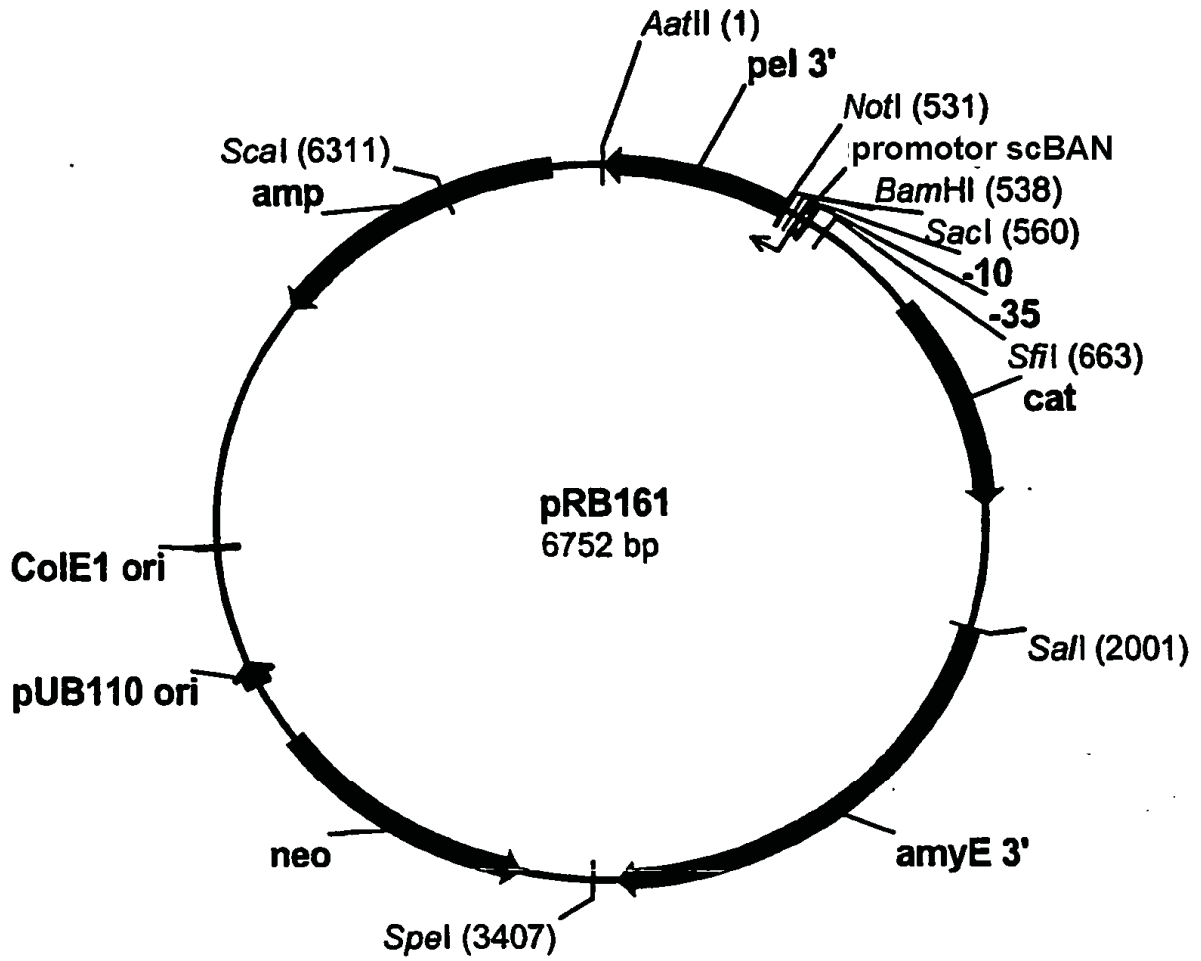


Fig. 40

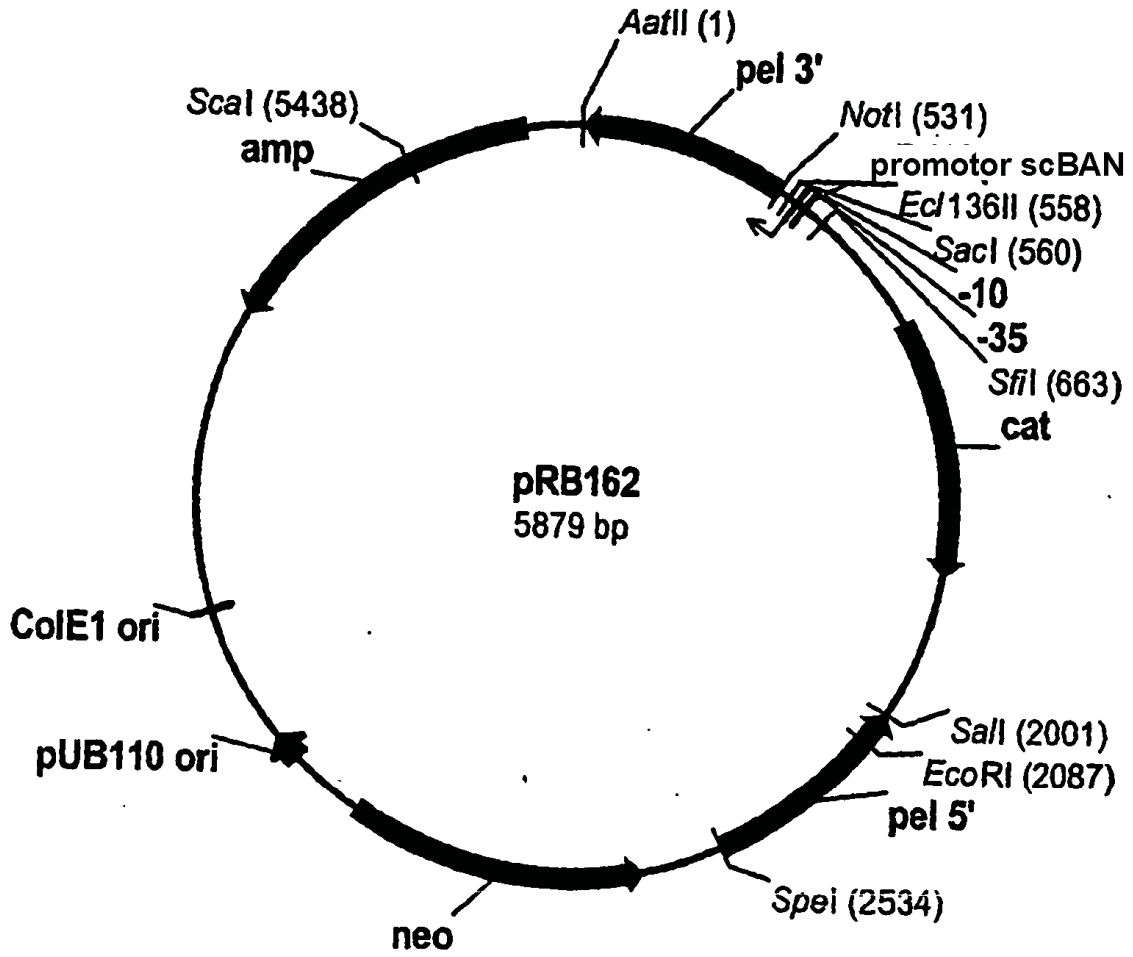


Fig. 41

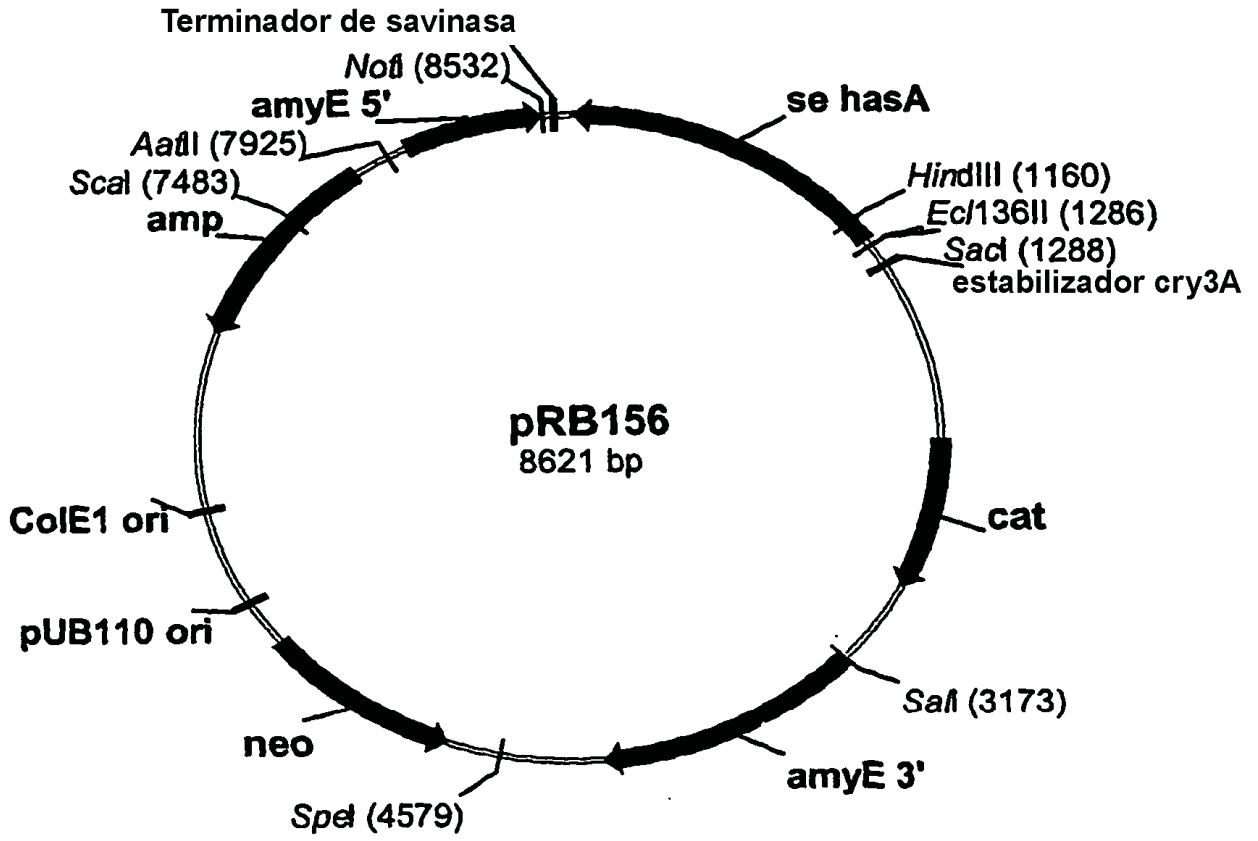


Fig. 42

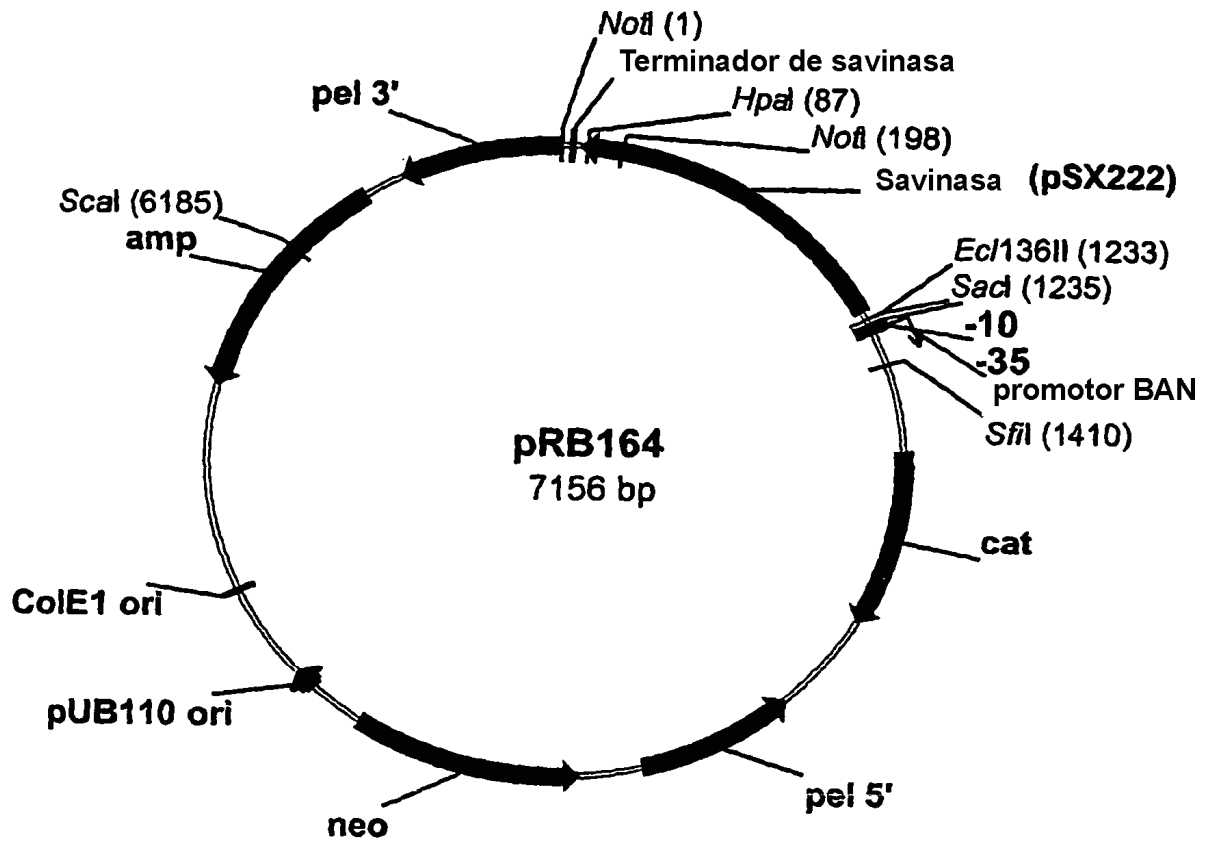


Fig. 43

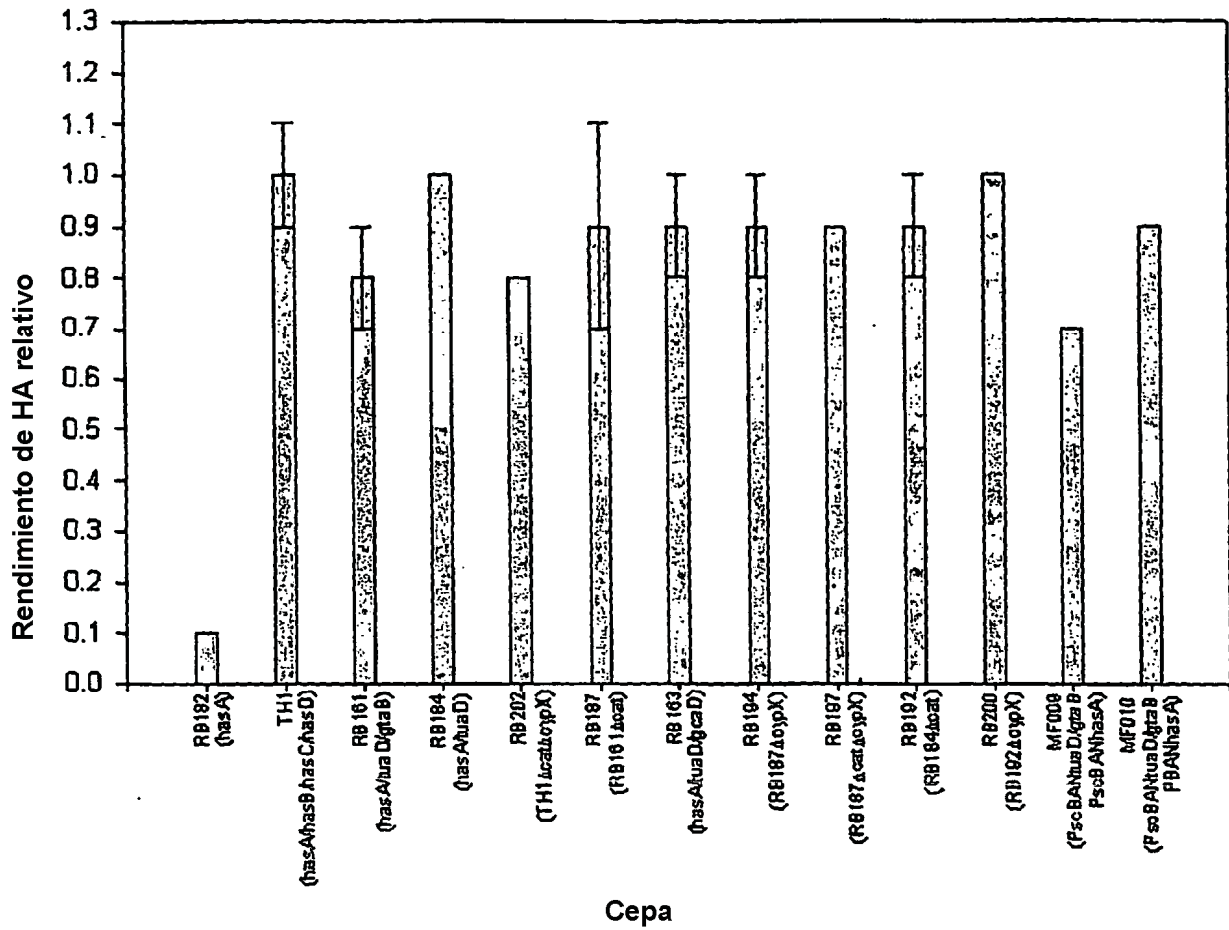


Fig. 44

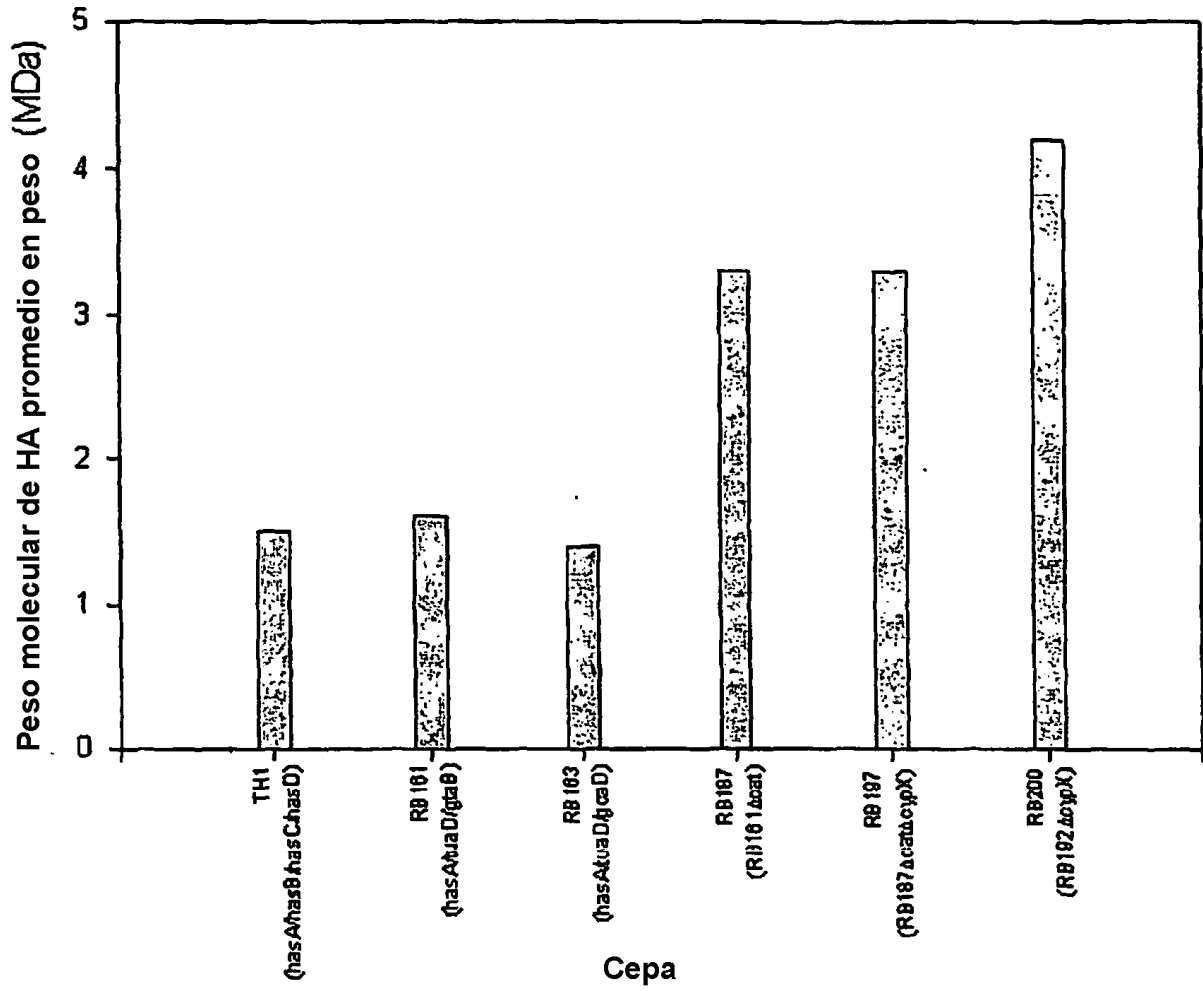


Fig. 45