

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 027**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01987798 .4**
- 96 Fecha de presentación: **16.10.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1326984**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Citocromo P450 monooxigenasas de bacterias termófilas**

30 Prioridad:
16.10.2000 DE 10051175

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
BASF SE
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:
HAUER, Bernhard;
SCHMID, Rolf;
MERKL, Rainer y
BLASCO, Francesca

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 382 027 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

Citocromo p450 monooxigenasas de bacterias termófilas

5 La invención se refiere a nuevas citocromo P450 monooxigenasas de bacterias termófilas, en particular del género *Thermus* sp., a las secuencias de nucleótidos que codifican para ello, la producción recombinante de estas monooxigenasas y su aplicación para la oxidación microbiológica de compuestos orgánicos.

Las citocromo P450 monooxigenasas poseen la capacidad de catalizar reacciones de oxigenación comercialmente interesantes y por ello son investigadas intensamente desde hace algún tiempo. De este modo se aisló y caracterizó por ejemplo la citocromo P450 monooxigenasa BM-3 de *Bacillus megaterium* y está disponible actualmente por la vía recombinante (ver por ejemplo DE-A-199 35 115).

10 Esta citocromo P450-monooxigenasa cataliza usualmente la hidroxilación subterminal de ácidos saturados de cadena larga y las correspondientes amidas y alcoholes de ellos o la epoxidación de ácidos grasos insaturados de cadena larga o ácidos grasos saturados con longitud media de cadena. La longitud óptima de cadena de ácidos grasos saturados es de 14 a 16 átomos de carbono.

15 La estructura del dominio hem de P450 BM-3 fue determinada mediante análisis estructural de rayos X. Los sitios de unión al sustrato están presentes en forma de una abertura larga de tipo túnel, el cual alcanza desde la superficie de la molécula justamente hasta la molécula hem y está limitado casi exclusivamente por radicales hidrófobos de aminoácido. Los únicos radicales cargados sobre la superficie del dominio hem son los radicales Arg47 y Tyr51. Se supone que estos participan en la unión de los grupos carboxilato del sustrato mediante la formación de un enlace de puente hidrógeno. Esta introducción focalizada de mutaciones puntuales es medianamente exitosa en la
20 ampliación del espectro de sustrato de esta enzima. Así, mediante esta enzima pueden oxidarse actualmente también ácidos carboxílicos, alcanos, alquenos tanto de cadena corta como de cadena larga, cicloalcanos, cicloalquenos y diferentes compuestos aromáticos (ver DE-A-199 35 115, 199 55 605, 100 11 723 y 100 14 085).

25 De allí que para mejorar más la aplicabilidad industrial de este tipo de enzimas era deseable encontrar nuevas citocromo P450-monooxigenasas, las cuales se ajustaran mejor a las condiciones de producción industrial, como por ejemplo enzimas con elevada estabilidad térmica.

De allí que fue objetivo de la presente invención poner a disposición citocromo P450-monooxigenasas, que se ajustaran mejor a las condiciones de producción industrial.

30 El objetivo de arriba fue logrado poniendo a disposición una citocromo P450 monooxigenasa según la reivindicación 1. Ella puede incluir en particular una secuencia parcial de radicales aminoácido Pro328 a Glu345 según SEQ ID NO:2 y preferiblemente además una secuencia parcial de radicales aminoácido Val216 a Ala227 según SEQ ID NO:2.

35 Se manifiestan citocromo P450 monooxigenasas que exhiben una secuencia de aminoácidos, la cual incluye al menos otra secuencia parcial que es elegida de entre una secuencia parcial de al menos 10 aminoácidos consecutivos de los rangos de secuencia especificados por los radicales aminoácido Met1 a Phe327 y Gly346 a Ala389 según SEQ ID NO:2.

Una citocromo P450 monooxigenasa particularmente preferida posee una secuencia de aminoácidos que corresponde esencialmente a SEQ ID NO: 2.

40 Las citocromo P450 monooxigenasas acordes con la invención pueden ser aisladas en particular de bacterias termófilas, preferiblemente del género *Thermus* sp., como por ejemplo de la especie *Thermus thermophilus*, cepa HB27 (depositada por DSM bajo el número DSM7039). Las bacterias "termófilas" satisfacen de acuerdo con la invención los criterios de tolerancia a la temperatura según H.G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, editorial Thieme Stuttgart, 5ª edición, página 173, para organismos termófilos y termófilos extremos (es decir crecimiento óptimo por encima de 40 °C).

45 Las monooxigenasas acordes con la invención se caracterizan preferiblemente con una elevada estabilidad a la temperatura. Ésa se expresa en una baja pérdida de actividad a elevada temperatura (por ejemplo el rango de 30 a 60 °C, pH 7,5, 25mM Tris/HCl) en comparación con la de P450 BM-3 de *Bacillus megaterium*.

50 Según una forma preferida de operar, se pone a disposición una citocromo P450 monooxigenasa acorde con la invención de la bacteria termófila *T. thermophilus*. La proteína posee un peso molecular de aproximadamente 44 kDa (determinado mediante electroforesis en gel SDS), es soluble y muestra en el estado reducido, estado oxidado y como producto de adición carbonílica un espectro de absorción análogo al de otras enzimas P450. A partir de

- 5 comparaciones de secuencia de esta enzima acorde con la invención de *T. thermophilus* y otras enzimas P450 conocidas pudieron determinarse las siguientes identidades: P450 BM3, 32% de identidad; CYP119, 29% de identidad; P450eryF, 31% de identidad. La enzima acorde con la invención muestra una extraordinaria estabilidad térmica, ilustrada por una temperatura de fusión de aproximadamente 85°C, cuyo valor está 30°C por encima de la de P450cam.
- Se manifiestan además oligonucleótidos, que hibridan con una secuencia de ácidos nucleicos, que codifican para una citocromo P450 monooxigenasa acorde con la invención.
- 10 En particular se manifiestan también tales oligonucleótidos, que incluyen una secuencia de ácidos nucleicos que es esencialmente complementaria a un rango de secuencia de nucleótido que incluye al menos 30 a 45 radicales nucleótido consecutivos, según SEQ ID NO:1.
- 15 Se manifiestan polinucleótidos que hibridan con un oligonucleótido según la definición de arriba y codifica para una citocromo P450 monooxigenasa, en particular una citocromo P450 monooxigenasa de otros microorganismos como por ejemplo aquellos del género *Thermus* sp.. Son objetivo de la invención también en particular polinucleótidos que codifican para una citocromo P450 monooxigenasa según la definición de arriba, así como los polinucleótidos complementarios.
- Los polinucleótidos preferidos son aquellos que esencialmente poseen una secuencia de ácidos nucleicos según SEQ ID NO: 1, así como la secuencia de ácidos nucleicos complementarios a ella.
- 20 Otro objetivo de la invención consiste en cintas de expresión para la producción recombinante de monooxigenasas acordes con la invención, que incluyen al menos una secuencia reguladora de ácidos nucleicos enlazada de modo operativo con al menos uno de los polinucleótidos arriba indicados.
- 25 Otros objetivo de la invención se refiere a los vectores recombinantes, que portan al menos un polinucleótido o al menos una cinta de expresión según la definición de arriba; así como microorganismos que contienen al menos uno de tales vectores recombinantes; así como métodos para la producción de citocromo P450 monooxigenasas acordes con la invención, en los cuales se cultiva un microorganismo que produce la citocromo P450 monooxigenasa y se aísla la monooxigenasa del cultivo.
- Las enzimas acordes con la invención y los mutantes que pueden derivarse de ellas son útiles como biocatalizadores para diferentes reacciones bioquímicas de oxigenación de compuestos orgánicos según la definición en las reivindicaciones de significado técnico. De modo análogo, pueden utilizarse también los microorganismos recombinantes acordes con la invención para la ejecución de tales reacciones de oxigenación.
- 30 De allí que otro objetivo de la invención se refiere a un método para la oxidación microbiológica de un compuesto orgánico según la definición de las reivindicaciones, donde se hace reaccionar este compuesto con al menos una citocromo P450 monooxigenasa acorde con la invención.
- Preferiblemente se ejecuta este método de modo que
- 35 a1) se cultiva un microorganismo recombinante según la definición de arriba en un medio de cultivo, en presencia del compuesto orgánico exógeno (añadido desde afuera) o formado de modo intermedio, el cual es un sustrato de la monooxigenasa, preferiblemente en presencia de oxígeno y dado el caso un donador de electrones; o
- a2) se incubaba un medio de reacción que contiene el sustrato, preferiblemente en presencia de oxígeno y un donador de electrones, con una citocromo P450 monooxigenasa acorde con la invención; y
- b) se aísla del medio el producto de oxidación formado o un producto de reacción de él.
- 40 En ello, el sustrato exógeno o formado por vía intermedia puede ser elegido de entre:
- a) dado el caso compuestos aromáticos sustituidos heterocíclicos con N, O o S, mono, di o polinucleares; (que no son objetivo de la presente invención)
- b) dado el caso compuestos aromáticos sustituidos mono o polinucleares; (no son objetivo de la presente invención)
- c) alcanos y alquenos de cadena recta o ramificada (no objetivo de la presente invención)
- 45 d) dado el caso cicloalcanos y cicloalquenos sustituidos; y

e) ácidos carboxílicos alifáticos, preferiblemente terminalmente saturados (no objetivo de la presente invención)

Según una primera variante preferida de método acorde con la invención, se ejecuta la oxidación mediante cultivo de los microorganismos en presencia de oxígeno a una temperatura de cultivo de por lo menos aproximadamente 20 °C y un valor de pH de aproximadamente 6 a 9.

- 5 Según una segunda variante preferida del método acorde con la invención, se añade como sustrato exógeno al menos un compuesto elegido de entre los grupos d) arriba definido a un medio y se ejecuta la oxidación mediante reacción enzimática del medio que contiene sustrato en presencia de oxígeno a una temperatura de por lo menos aproximadamente 20°C y un valor de pH de aproximada mente 6 a 9, donde además el medio contiene sustrato que
10 contiene, referido al sustrato, un exceso molar de equivalentes de reducción (donor de electrones) de aproximadamente 10 a 100 veces.

Los métodos arriba mencionados pueden ser ejecutados preferiblemente en birreactores. De allí que son objetivos de la invención tales birreactores, incluyendo al menos una monooxigenasa acorde con la invención o al menos un microorganismo recombinante, dado el caso respectivamente en forma inmovilizada.

- 15 Finalmente, la invención se refiere al empleo de una citocromo P450 monooxigenasa, un vector o un microorganismo según la presente invención, para la oxidación microbiológica de los tipos arriba mencionados de compuestos orgánicos.

La invención ahora es ilustrada con referencia a las figuras adjuntas. En ello

- 20 La figura 1 muestra una comparación de secuencia de P450 de *Thermus thermophilus* con el dominio hem de P450 BM3 de *Bacillus megaterium*. En ello, se muestran con doble subrayado los sitios de unión de hem (Cys400 en P450 BM3 es el radical cisteína, el cual coordina con el átomo de hierro del grupo prostético). Con subrayado sencillo está la región que está en contacto con el extremo ω de la cadena de ácido graso. El grado de concordancia está caracterizado mediante diferentes símbolos ("*" = radicales idénticos; ":"redondo"." = radicales similares).

- 25 La figura 2 muestra el resultado de una prueba de comparación para la determinación de la estabilidad térmica de P450 BM3 y P450 de *Thermus sp.*. La estabilidad térmica fue determinada por espectrometría en el rango de longitud de onda entre 400 y 500nm sobre el contenido de grupos hem.

Se manifiestan asimismo "equivalentes funcionales" de las nuevas P450 monooxigenasas manifestadas específicamente.

- 30 Los "equivalentes funcionales" o análogos de las monooxigenasas manifestadas específicamente son enzimas diferentes de ellas, las cuales poseen además la especificidad de sustrato deseada en el marco de la reacción de oxidación d) arriba definida y/o una elevada estabilidad térmica en comparación con P450 BM3, por ejemplo a temperaturas en el rango de aproximadamente 30 a 60 °C y dado el caso temperaturas más altas después de tratamiento por 30 minutos en Tris/HCl 25mM.

- 35 De acuerdo con la invención, se entiende por "equivalentes funcionales" en particular mutantes que en al menos una de las posiciones de secuencia arriba mencionadas exhiben otro aminoácido diferente al mencionado específicamente, pero a pesar de ello catalizan una de las reacciones de oxidación arriba mencionadas. Los "equivalentes funcionales" incluyen 1 a 30 o 1 a 20 o 1 a 10 adiciones, sustituciones, borrados y/o inversiones de aminoácidos de los mutantes obtenibles, donde las modificaciones mencionadas pueden presentarse en cada posición de secuencia, en tanto ella conduzca a un mutante con el perfil de propiedades acorde con la invención. Se presenta también la equivalencia funcional en particular cuando el patrón de reactividad entre el mutante y la enzima
40 no modificada concuerdan cualitativamente, es decir por ejemplo reaccionan los mismos sustratos con diferente velocidad.

- 45 De acuerdo con la invención con "equivalentes funcionales" incluidos exhiben una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO:2 en por lo menos una posición, donde el cambio en la secuencia modifica la actividad de la monooxigenasa preferiblemente sólo de modo no esencial, es decir en no más de aproximadamente 90%, en particular 50% o en no más de 30%. Este cambio puede ser determinado mediante el empleo de un sustrato de referencia, como por ejemplo β-ionona, bajo condiciones estandarizadas (por ejemplo sustrato 0,1 a 0,5 M, rango de pH de 6 a 8, en particular 7; T = 60 a 70°C, en particular 65°C).

- 50 Los "equivalentes funcionales" son homólogos a los protones manifestados específicamente. Estos poseen al menos 60 %, preferiblemente al menos 75% en particular por lo menos 85 %, como por ejemplo 90%, 95% o 99% de homología con una secuencia manifestada específicamente, calculado según el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Los homólogos de las proteínas o polipéptidos acordes con la invención pueden ser generados mediante mutagénesis, por ejemplo mediante mutación puntual o acortamiento de la proteína.

5 Pueden identificarse homólogos de la proteína acorde con la invención mediante tamizaje de bancos combinatorios de mutantes, por ejemplo mediante acortamiento de mutantes. Por ejemplo puede generarse un variopinto banco de
 10 variantes de proteína mediante mutagénesis combinatoria sobre planos de ácido nucleico, como por ejemplo mediante unión enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Hay una multiplicidad de métodos que pueden ser empleados para la producción de bancos potencialmente homólogos de una secuencia degenerada de oligonucleótidos. La síntesis química de una secuencia degenerada de genes puede ser ejecutada en un equipo automático de síntesis de ADN, y el gen sintético puede entonces ser ligado a un vector adecuado de expresión. El
 15 empleo de una frase degenerada de gen hace posible poner a disposición la totalidad de las secuencias en una mezcla, la cual codifica la frase deseada sobre secuencias potenciales de proteína. Los expertos conocen métodos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados (por ejemplo Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

15 Los "equivalentes funcionales" incluyen naturalmente también P450-monooxigenasas, las cuales son accesibles también a partir de otros organismos, por ejemplo a partir de otros diferentes a las bacterias mencionadas aquí específicamente, así como variantes que ocurren de modo natural. Por ejemplo, mediante comparación de secuencias se estipulan rangos de regiones homólogas de secuencia y determinan enzimas equivalentes con base en los estándares concretos de la invención.

20 Dado el caso, los sustratos oxidables del grupo a) son compuestos aromáticos heterocíclicos sustituidos mono, di o polinucleares; en particular compuestos aromáticos oxidables o hidroxilables heterocíclicos con N, O o S mono, di o polinucleares. Ellos incluyen por ejemplo dos o tres anillos condensados de cuatro a siete miembros, en particular de seis o cinco miembros, donde al menos uno, preferiblemente todos los anillos poseen carácter aromático y donde al menos uno de los anillos aromáticos porta en el anillo uno a tres, preferiblemente un heteroátomo N, O o S. En la
 25 totalidad de la estructura anular pueden estar presentes dado el caso uno o dos otros heteroátomos iguales o diferentes. Además los compuestos aromáticos pueden portar 1 a 5 sustituyentes en el carbono del anillo o en los heteroátomos. Son ejemplos de sustituyentes adecuados alquilo C₁ a C₄, como metilo, etilo, n- o i-propilo o n-, i- o t-butilo o alquenilo C₂ a C₄, como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo o 3-butenilo, hidroxilo y halógeno, como F, Cl, y Br. Los mencionados sustituyentes alquilo o alquenilo pueden exhibir dado el caso también un grupo ceto o aldehído; para ello son ejemplos propan-2-on-3-ilo, butan-2-on-4-ilo, 3-buten-2-on-4-ilo. Son en particular ejemplos no limitantes de sustratos heterocíclicos adecuados los heterociclos binucleares, como indol, N-metilindol y los análogos de ellos sustituidos con uno a tres sustituyentes en los átomos de carbono, como por ejemplo 5-cloro- o 5-bromo-indol; así como quinolina y derivados de quinolina, como por ejemplo 8-metilquinolina, 6-metilquinolina y quinaldina; y benzotiofeno y los análogos derivados de ellos sustituidos con uno a tres sustituyentes
 30 en los átomos de carbono. Además se mencionan compuestos heteroaromáticos trinucleares, como acridina, y los análogos derivados de ellos sustituidos con uno a tres sustituyentes en los átomos de carbono.

35 Son sustratos oxidables del grupo b) compuestos aromáticos mono o polinucleares, en particular mono o binucleares, dado el caso sustituidos, como benceno y naftaleno. Los compuestos aromáticos pueden ser dado el caso sustituidos una o varias veces y portar por ejemplo 1 a 5 sustituyentes en los átomos de carbono del anillo. Son ejemplos de sustituyentes adecuados alquilo C₁ a C₄, como metilo, etilo, n- o i-propilo o n-, i- o t-butilo, o alquenilo C₂ a C₄, como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo o 3-butenilo, hidroxilo y halógeno, como F, Cl, y Br. Los mencionados sustituyentes alquilo o alquenilo pueden exhibir dado el caso también un grupo ceto o aldehído; son ejemplos de ello propan-2-on-3-ilo, butan-2-on-4-ilo, 3-buten-2-on-4-ilo. Los compuestos aromáticos pueden estar dado el caso condensados con un anillo no aromático de cuatro a siete miembros. El anillo no
 40 aromático puede exhibir dado el caso uno o dos dobles enlaces C-C, estar sustituido una o varias veces con sustituyentes arriba mencionados y portar dado el caso uno o dos heteroátomos en el anillo. Son ejemplos de compuestos aromáticos particularmente útiles los compuestos aromáticos mononucleares, como cumeno, así como sustratos dinucleares, como indeno y naftaleno, así como los análogos de ellos sustituidos con uno a tres sustituyentes en los átomos de carbono.

50 Los sustratos oxidables del grupo c) son alcanos o alquenos de cadena recta o ramificados con 4 a 15, preferiblemente 6 a 12 átomos de carbono. Como ejemplos pueden mencionarse n-pentano, n-hexano, n-heptano-, n-octano, n-nonano, n-decano, n-undecano y n-dodecano, así como los análogos mono o poliramificados de estos compuestos, como por ejemplo compuestos análogos con 1 a 3 grupos metilo laterales; o los análogos insaturados una o varias veces, por ejemplo una vez, de los alcanos arriba mencionados.

55 Son sustratos oxidables acordes con la invención del grupo d) cicloalcanos y cicloalquenos dado el caso sustituidos. Son ejemplos de ello ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexeno, cicloheptano y ciclohepteno. En ello, la estructura anular puede estar sustituida una o varias veces y portar por ejemplo 1 a 5 sustituyentes según las

definiciones de arriba para compuestos de los grupos a) y b). Son ejemplos no limitantes de ello las iononas, como α - β - y δ - ionona, así como las correspondientes metiliononas e isometiliononas.

Son sustratos oxidables del grupo e) ácidos carboxílicos C_8 - C_{30} de cadena recta o ramificados, saturados o mono o poliinsaturados, en particular ácidos monocarboxílicos, o derivados de ácidos carboxílicos, como ésteres y amidas.

5 Como ejemplos son de mencionar ácidos monocarboxílicos saturados terminales o subterminales (posiciones ω -1-, ω -2- o ω -3) hidroxilables.

Son objetivo de la invención también secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de ADN y ARN de cuerda sencilla y cuerda doble), que codifican para una de las monooxigenasas arriba mencionadas y sus equivalentes funcionales. Otras secuencias de ácidos nucleicos acordes con la invención se derivan de SEQ ID NO:1 y se diferencian entre sí por la adición, sustitución, inserción o borrado de nucleótidos individuales o múltiples, que codifican además para una monooxigenasa con el perfil deseado de propiedades.

10

De acuerdo con la invención se incluyen también tales secuencias de ácidos nucleicos que abarcan las denominadas mutaciones silentes o de modo correspondiente el uso del codón de un organismo especial huésped u original, están modificadas comparadas con una secuencia mencionada específicamente, así mismo como variantes de ellas que ocurren de modo natural, como por ejemplo variantes de empalme. Son objetivo así mismo secuencias obtenibles mediante sustituciones conservantes de nucleótidos (es decir se reemplaza el aminoácido en cuestión por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad/o solubilidad).

15

Además se manifiestan también secuencias de ácido nucleicos, que hibridan con las secuencias que codifican arriba mencionadas o son complementarias con ellas. Éstos polinucleótidos son localizados mediante barrido completo de bibliotecas genómicas o de cADN y dado el caso multiplicación de ellas con cebadores adecuados por medio de PCR y subsiguiente aislamiento por ejemplo con sondas adecuadas. Otra posibilidad ofrece la transformación de microorganismos adecuados con polinucleótidos o vectores acordes con la invención, la multiplicación de microorganismos y con ello de los polinucleótidos y su subsiguiente aislamiento. Además pueden sintetizarse polinucleótidos acordes con la invención también por vía química.

20

Se entiende por la propiedad de un polinucleótido de poderse "hibridar" a la capacidad de un poli u oligonucleótido para enlazarse bajo condiciones exigentes sobre una secuencia casi complementaria, mientras que bajo estas condiciones omite formaciones no específicas entre asociados no complementarios. Para ello, las secuencias deberían ser complementarias en 70-100%, preferiblemente 90-100%. La propiedad de las secuencias complementarias de poder unirse específicamente una a otra, es aprovechada por ejemplo en las técnicas de Northern- o Southern-Blot o en la unión de cebador en PCR o RT-PCR. Comúnmente se emplean para ello oligonucleótidos desde una longitud de 30 pares de bases. Se entiende por condiciones exigentes por ejemplo en la técnica Northern-Blot el empleo de una solución caliente de lavado a 50 - 70 °C, preferiblemente 60 - 65 °C, por ejemplo tampón 0,1 x SSC con 0,1% SDS (20x SSC: NaCl 3M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7,0) para la elución de sondas de cADN u oligonucleótidos hibridados de modo no específico. En ello, como se mencionó arriba, permanecen enlazados uno a otro sólo los ácidos nucleicos complementarios en alta medida.

25
30
35

Son además objetivo de la invención fragmentos de expresión, que contienen bajo el control genético de secuencias reguladoras de ácidos nucleicos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un mutante acorde con la invención; así como vectores que incluyen al menos uno de estos fragmentos de expresión. Preferiblemente tales fragmentos acordes con la invención incluyen un promotor en dirección 5'-hacia arriba de la respectiva secuencia que codifica y una secuencia de terminación en dirección 3'-hacia abajo, así como dado el caso otros elementos reguladores comunes, y concretamente en cada caso unidos de modo operativo con la secuencia que codifica. Se entiende por una "unión de modo operativo" la disposición secuencial de promotor, secuencia de codifica, terminator y dado el caso otros elementos reguladores de modo que cada elemento regulador puede satisfacer del modo esperado su función en la expresión de la secuencia que codifica. Son ejemplos de secuencias que pueden ser unidas de modo operativo, secuencias focalizadas así como potenciadores de traducción, amplificadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos reguladores incluyen marcadores que pueden ser seleccionados, señales de amplificación, originales de replicación y similares.

40
45

Adicionalmente a las secuencias artificiales de regulación, las secuencias naturales de regulación pueden estar presentes antes del verdadero gen estructural. Esta regulación natural puede ser dado el caso desactivada mediante modificación genética y la expresión de los genes puede ser aumentada o reducida. El fragmento de gen puede también estar construido de modo sencillo, es decir no se inserta ninguna señal adicional de regulación antes del gen estructural y no se elimina el promotor natural con su regulación. En lugar de ello, muta la secuencia natural de regulación de modo que no ocurre ya ninguna regulación y se eleva o se reduce la expresión del gen. Las secuencias de ácido nucleico pueden estar presentes en una o varias copias en el fragmento del gen.

50

Son ejemplos de promotores útiles: promotor cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpplac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, I-PR o en el I-PL, los cuales pueden encontrar aplicación de modo ventajoso en bacterias gram-negativas; así

55

como los promotores grampositivos amy y SPO2, los promotores de levaduras ADC1, MFA , AC, P-60, CYC1, GAPDH o los promotores vegetales CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS9, B33, not o el promotor de ubiquitina o de faseolina. De modo particular se prefiere el empleo de promotores inducibles, como por ejemplo promotores que pueden ser inducidos por la luz y en particular por la temperatura, como el promotor PrP1.

- 5 En principio todos los promotores naturales pueden ser empleados con sus secuencias de regulación. Además pueden emplearse de modo ventajoso también promotores sintéticos.

10 Las secuencias de regulación mencionadas deberían hacer posible la expresión focalizada de las secuencias de ácidos nucleicos y la expresión de proteína. Esto puede por ejemplo significar que, dependiendo del organismo huésped, el gen es expresado o sobreexpresado sólo hasta después de la inducción, o que es expresado y/o sobreexpresado inmediatamente.

15 En ello, las secuencias o bien factores reguladores pueden preferiblemente influir positivamente y mediante ello y elevar o reducir la expresión. De este modo puede ocurrir ventajosamente un fortalecimiento de los elementos reguladores sobre los planos de transcripción, en lo cual se emplean fuertes señales de transcripción como promotores y/o "potenciadores". Aparte de ello, es posible también un fortalecimiento de la traducción, en lo cual por ejemplo mejora la estabilidad del mRNA.

20 La producción de una cinta de expresión ocurre mediante la fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos adecuada de monooxigenasa así como una señal de terminación o de poliadenilación. Para ello se emplean técnicas corrientes de recombinación y clonación, como se describen por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

25 El fragmento recombinante de ácidos nucleicos o bien el fragmento del gen es insertado ventajosamente para la expresión en un organismo huésped adecuado en un vector específico del huésped, lo cual hace posible una expresión óptima de los genes en el huésped. Los vectores son bien conocidos por los expertos y pueden ser tomadas por ejemplo de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985). Se entiende por vectores, además de los plásmidos, también todos los otros vectores conocidos por los expertos como por ejemplo fagos, virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposons, elementos IS, plásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden ser replicados de modo autónomo en
30 organismos huésped o pueden replicarse por vía cromosómica.

35 Con ayuda de los vectores acordes con la invención pueden producirse microorganismos recombinantes, los cuales están transformados por ejemplo con al menos un vector acorde con la invención y pueden ser empleados para la producción de los mutantes. De modo ventajoso, los fragmentos recombinantes acordes con la invención arriba descritos son introducidos y expresados en un sistema huésped adecuado. En ello, para expresar los mencionados ácidos nucleicos en los respectivos sistemas de expresión se emplean preferiblemente métodos de clonación y transfección conocidos corrientemente por los expertos, como por ejemplo co-precipitación, fusión de protoplastos, electroevaporación, transfección retroviral y similares. Por ejemplo se describen sistemas adecuados en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, Nueva York 1997.

40 En principio como organismos huésped son adecuados todos los organismos que hacen posible una expresión de los ácidos nucleicos acordes con la invención, sus variantes de alelo, sus equivalentes funcionales o derivados. Se entiende por organismos huésped por ejemplo bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o animales. Son organismos preferidos bacterias, como aquellos de los géneros Escherichia, como por ejemplo Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus o Pseudomonas, microorganismos eucaróticos, como Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, células eucarióticas superiores de animales o plantas, por ejemplo células Sf9 o CHO.

45 La selección de organismos exitosamente transformados puede ocurrir mediante genes marcadores, que están presentes así mismo en el vector o en la cinta de expresión. Son ejemplos de tales genes marcadores los genes para la resistencia de antibióticos y para enzimas, que catalizan una reacción que genera color y causan una tinción de las células transformadas. Éstas pueden entonces ser seleccionadas por medio de clasificación celular automática. Los microorganismos exitosamente transformados con un vector, que portan un correspondiente gen de
50 resistencia a los antibióticos (por ejemplo G418 o higromicina) son seleccionados mediante los correspondientes medios o medios de cultivo que contienen antibiótico. Las proteínas marcadoras que se presentan sobre la superficie celular, pueden ser empleadas para la selección por medio de cromatografía de afinidad.

55 La combinación de los organismos huésped y los vectores que se ajustan a los organismos, como plásmidos, virus o fagos, como por ejemplo plásmidos con el sistema promotor/polimerasa de ARN, los fagos λ o P u otros fagos temperantes o transposons y/u otras secuencias reguladoras ventajosas forman un sistema de expresión. Por

ejemplo bajo el concepto "sistema de expresión" se entiende la combinación de células de mamíferos, como células CHO, y vectores, como vector pcADN3neo, que son adecuados para células de mamíferos.

En caso de desearse, el producto de gen puede llevarse a la expresión también en organismos transgénicos, como animales transgénicos, como en particular ratones u ovejas o plantas transgénicas.

- 5 Son además objetivo de la invención métodos para la producción recombinante de una monooxigenasa acorde con la invención, donde se cultiva un microorganismo que produce monooxigenasa, dado el caso se induce la expresión de la monooxigenasa y se aísla del cultivo la monooxigenasa. En caso de desearse, la monooxigenasa puede entonces ser producida a gran escala industrial.

- 10 Los microorganismos recombinantes pueden ser cultivados y fermentados según métodos conocidos. Las bacterias pueden ser multiplicadas por ejemplo en medios TB o LB y a una temperatura de 20 a 40°C y un valor de pH de 6 a 9. Por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) se describen en detalle condiciones adecuadas de cultivo.

- 15 En caso de que la monooxigenasa no sea secretada en el medio de cultivo, las células son entonces desintegradas y se obtiene la enzima según métodos conocidos de aislamiento de proteína a partir del lisado. Según se desee, las células pueden ser desintegradas mediante ultrasonido de alta frecuencia, mediante alta presión, como por ejemplo en una celda de presión, mediante osmólisis, mediante reacción de detergentes, enzimas líticas o solventes orgánicos, mediante homogenizadores, o mediante combinación de varios de los métodos enumerados.

- 20 Puede lograrse una purificación de la monooxigenasa con métodos cromatográficos conocidos, como cromatografía de tamiz molecular (filtración por gel), como cromatografía de Q-Sefarosa, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba, así como con otros métodos comunes, ultrafiltración, cristalización, precipitación mediante sales, diálisis y electroforesis nativa por gel. Por ejemplo, en Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, editorial Walter de Gruyter, Berlin, Nueva York o en Scopes, R., Protein Purification, editorial Springer, Nueva York, Heidelberg, Berlin se describen métodos adecuados.

- 25 Para el aislamiento de la proteína recombinante es particularmente ventajoso emplear sistemas de vector u oligonucleótidos, que alargan el cADN en determinadas secuencias de nucleótidos y codifican de ellos para polipéptidos o proteínas de fusión modificados, que sirven para una purificación más sencilla. Tales modificaciones adecuadas son por ejemplo denominadas "tags" que funcionan como ancla, como por ejemplo la modificación o epítipo conocidos como ancla de hexa-histidina, que pueden ser reconocidos como antígenos de anticuerpos (descritos por ejemplo en Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Estas anclas pueden servir para la sujeción de las proteínas sobre un soporte fijo, como por ejemplo una matriz de polímero, que puede ser empacada por ejemplo en una columna de cromatografía, o puede ser empleada en una placa Mikrotiter o en otro soporte.
- 30

- 35 Simultáneamente pueden emplearse estas anclas también para el reconocimiento de las proteínas. Para el reconocimiento de las proteínas pueden emplearse además marcadores comunes, como colorantes de fluorescencia, marcadores de enzimas que después de la reacción con el sustrato forma un producto de reacción detectable, o marcadores reactivos, solos o en combinación con las anclas para la formación de derivados de las proteínas.

La invención se refiere además a un método para la oxidación microbiológica de compuestos orgánicos de los tipos mencionados arriba.

- 40 Si se ejecuta la reacción con un microorganismo recombinante, entonces ocurre preferiblemente primero el cultivo del microorganismo en presencia de oxígeno y en un medio complejo, como por ejemplo medio TB o LB a una temperatura de cultivo de aproximadamente 20 °C o más, y un valor de pH de aproximadamente 6 a 9, hasta alcanzar una suficiente densidad celular. Para poder controlar mejor la reacción de oxidación, se prefiere el empleo de un promotor inducible. Después de la inducción de la producción de monooxigenasa se continúa el cultivo en presencia de oxígeno por 12 horas a 3 días.
- 45

- 50 Si por el contrario se realiza la reacción acorde con la invención con enzima pura o concentrada, entonces se disuelve la enzima acorde con la invención en un medio que contiene sustrato exógeno (aproximadamente 0,01 a 10 mM, o 0,05 a 5 mM), y se ejecuta la transformación preferiblemente en presencia de oxígeno a una temperatura de aproximadamente 10 °C o más, y un valor de pH de aproximadamente 6 a 9 (como por ejemplo ajustado con tampón de fosfato o Tris 100 a 200 mM), así como en presencia de un agente reductor, donde el medio que contiene sustrato que contiene además, referido al sustrato que va a ser oxidado, un exceso de aproximadamente 10 a 100 veces de equivalente molar de reducción. El agente reductor preferido es NADPH.

En el proceso de oxidación del sustrato acorde con la invención, el oxígeno presente en el medio de la reacción o añadido es escindido enzimáticamente de modo reductor. Los equivalentes de reducción requeridos son suministrados por el agente reductor añadido (donador de electrones).

5 El producto de oxidación formado puede ser separado del medio y purificado entonces de modo corriente, como por ejemplo mediante extracción o cromatografía.

Los siguientes ejemplos no limitantes describen formas especiales de operar de la invención.

Datos experimentales generales:

a) método general de clonación

10 Las etapas de clonación ejecutadas en el marco de la presente invención, como por ejemplo escisiones de restricciones, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos sobre nitrocelulosa y membranas de nylon, unión de fragmentos de ADN, transformación de células de *E. coli*, propagación de bacterias, multiplicación de fagos y análisis secuencial de ADN recombinante fueron descritos por Sambrook et al. (1989) en el lugar ya citado.

b) reacción de cadena de polimerasa (PCR)

15 Se ejecutó PCR según protocolo estándar con la siguiente carga estándar:

8 µl de mezcla de dNTP (200 µM), 10 µl de tampón de Taq-polimerasa (10 x) sin MgCl₂, 8 µl de MgCl₂ (25mM), por cada 1 µl de cebador (0,1 µM), 1µl de ADN que va a ser amplificado, 2,5 U de Taq-polimerasa (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), hasta 100 µl con agua desmineralizada.

c) cultivo de *E.coli*

20 El cultivo de cepas de *E. coli* DH5V recombinante fue cultivado en medio LB-Amp. (Trypton 10,0g, NaCl 5,0 g, extracto de levadura 5,0 g, ampicilina 100 g/ml, H₂O hasta 1000 ml) a 37°C. Para ello se trasladó en cada caso una colonia por medio de asa de inoculación desde una placa de agar en 5 ml de LB-Amp. Después de aproximadamente 18 h horas de cultivo a una frecuencia de agitación de 220 rpm se inocularon 400 ml de medio en un matraz de 2 litros con 4 ml de cultivo. La inducción de la expresión de P450 en *E. coli* ocurrió después de alcanzar un valor OD578 entre 0,8 y 1,0 mediante una inducción de choque por calor de tres a cuatro horas a 42 °C.

25

d) desintegración celular

30 Se descongelaron con hielo pellas de células con una biomasa húmeda de 15 g de *E. coli* DH5V y se suspendieron en 25 ml de tampón de fosfato de potasio (50 mM, pH 7,5, 1 mM de EDTA) o tampón de Tris/HCl (50 mM, pH 7,5, 1 mM de EDTA). Mediante tratamiento con ultrasonido por tres minutos (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Alemania), suministro de potencia de 80 W, intervalo de trabajo 20 %) se desintegró la suspensión celular de *E. coli* enfriada sobre hielo. Antes de la purificación de la proteína se centrifugó la suspensión celular por 20 min a 32 500 g y se filtró a través de un filtro de 0,22 mm Sterivex-GP (Millipore), donde se obtuvo un extracto crudo.

Ejemplo 1:

Clonación y expresión de P450 de *Thermus thermophilus* HB27 y del tag de His. Derivados de ellos

35 1. Clonación de P450 de *Thermus thermophilus* HB27

La secuencia que codifica P450 (con extremos romo) fue clonada en el corte Hindi del plásmido pTZ19R (MBI Fermentas). A partir del plásmido TTHB66 así obtenido se amplificó la secuencia que codifica P450 con ayuda de PCR. Para ello se obtuvo el siguiente cebador:

40 a) Oligonucleótido en sentido de 30-mer que contiene el corte NdeI-Schnittstelle (impreso en cursiva) como parte del codón de inicio P450-ATG:

5'-CGAAGCTCATATGAAGCGCCTTTCCCTGAG (SEQ ID NO:7).

b) Oligonucleótido anti-sentido de 30-mer que contiene el corte de EcoRI (impreso en cursiva) como parte del codón de parada TGA:

5'-GCGAATTCACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

El fragmento resultante fue clonado en el corte Ndel del vector pCYTEXP1 (plásmido con el sistema promotor inclusive por temperatura PRPL del bacteriófago 8 (Belev T.N., et al., Plásmido (1991) 26:147)) y transformado en *E. coli* DH-5 α (Clontech, Heidelberg).

- 5 Se inoculó *E. coli* DH-5 α que contenía el plásmido de interés, en medio LB en presencia de ampicilina y se incubó el cultivo durante la noche a 37 °C. Se inoculó una parte de la muestra en medio LB fresco (en presencia de ampicilina) y se cultivó el cultivo resultante a 37 °C hasta OD = 0,9. La inducción ocurrió mediante elevación de la temperatura a 42 °C por un período de tiempo de 24 horas. El cambio en el contenido de P450 durante la expresión fue determinado en virtud de mediciones del espectro diferencial CO.

Tiempo de expresión [h]	$\Delta_{A450-490}$	Concentración de P450 [PM]
4	0,092	0,056
8	0,176	0,106
24	0,106	0,064

10

2. Clonación de P450 de *Thermus thermophilus* HB27 con tag His terminal en N

La secuencia que codifica P450 fue amplificada mediante PCR del plásmido TTHB66 empleando el siguiente cebador:

- 15 (a) Oligonucleótido en sentido de 50-mer que contenía el corte Ndel (impreso en cursiva) como parte del codón de inicio P450 ATG y los codones se codifican tag (subrayado):

5'-CGAAGCT**CATATG**CATCACCATCATCATCACAAGCGCCTTTC (SEQ ID NO:9);

(b) Oligonucleótido anti-sentido de 30-mer que contenía el corte EcoRI (impreso en cursiva) como parte del cordón de parada TGA:

5'-GCG**AATTC**ACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

- 20 El fragmento resultante fue clonado en los cortes Ndel y EcoRI del vector p-CYTEXP1 y expresado en *E. coli* DH-5 α .

Se inoculó *E. coli* DH-5 α que contenía el plásmido de interés en medio LB en presencia de ampicilina y se incubó el cultivo durante la noche a 37 °C. Se inoculó una parte de la muestra en medio LB fresco (en presencia de ampicilina) y se cultivó el cultivo resultante a 37 °C hasta OD = 0,9. La inducción ocurrió mediante elevación de la temperatura a 42 °C por un espacio de tiempo de 24 horas. El cambio en el contenido de P450 durante la expresión fue determinado mediante medición del espectro diferencial CO.

25

Tiempo de expresión [h]	$\Delta_{A450-490}$	Concentración de P450 [PM]
4	ND	ND
8	0,097	0,073
24	0,111	0,072

3. Clonación de P450 de *Thermus thermophilus* HB27 con tag His terminal en C

La secuencia que codifica P450 fue amplificada mediante PCR de plásmido TTHB66 empleando el siguiente cebador:

(a) oligonucleótido en sentido de 30-mer que contiene el corte NdeI (impreso en cursiva) como parte del codón de inicio P450 ATG:

5 5'-CGAAGCT**CATATGA**AAGCGCCTTTCCCTGAG (SEQ ID NO:7)

(b) oligonucleótido antisentido de 47-mer que contienen el corte EcoRI (impreso en cursiva) como parte del codón de parada TGA así como la secuencia parcial que codifica tag subrayada:

5'-CGG**AATTC**AGTGATGATGATGGTGATGCGCCCGCACCTCCTC (SEQ ID NO:10).

El fragmento resultante fue clonado en los cortes NdeI y EcoRI del vector p-CYTEXP1 y expresado en E. coli DH-5α.

- 10 Se incubó E. coli DH-5α, que contenía el plásmido de interés, en medio LB en presencia de ampicilina y se incubó el cultivo durante la noche a 37 °C. Se inoculó una parte de la muestra en medio LB fresco (en presencia de ampicilina) y se cultivó el cultivo resultante a 37 °C hasta OD = 0,9. La inducción ocurrió mediante elevación de la temperatura a 42°C por un período de tiempo de 24 horas. El cambio en el contenido de P450 durante la expresión fue determinado en virtud de mediciones del espectro diferencial de CO.

Tiempo de expresión [h]	$\Delta_{A450-490}$	Concentración de P450 [PM]
4	ND	ND
8	0,1	0,075
24	ND	ND

15

Ejemplo 2:

Determinación de la estabilidad térmica de P450 de *Thermus thermophilus* en comparación con P450 BM3

- 20 Se incubaron a diferentes temperaturas las dos enzimas en cada caso por 30 minutos en tampón Tris/HCl de pH 7,5, 25mM. Se enfriaron a continuación las cargas y se determinó espectrométricamente la concentración de P450. En la siguiente tabla se resumen y en la figura 2 se representan gráficamente los resultados

Temperatura [°C]		30	40	50	60
Concentración de P450 [%]	P450 thermus	100	89	29	22
	P450 BM3	92	63	0	0

Como se toman los resultados de los ensayos, después de una incubación por 30 minutos a todas las temperaturas, la enzima acorde con la invención posee una estabilidad térmica significativamente superior.

Ejemplo 3:

- 25 Experimentos de biotransformación

El asociado redox endógeno para la citocromo P450 de *T. thermophilus* acorde con la invención no había podido ser hasta ahora identificado de manera inequívoca. Sin embargo se ha podido observar por ejemplo actividad enzimática en la hidroxilación de β- y/o α-ionona. Con β-ionona como sustrato pudo observarse la transformación hasta dar un producto principal, mientras que la α-ionona reaccionó hasta dar una mezcla de productos. Mediante la

comparación con estándares sintéticos pudo establecerse que el producto principal de la transformación de la β -ionona era 4-hidroxi- β -ionona.

5 Se inocularon cultivos previos de placas de agar de *T. thermophilus* [5 ml de medio Tt (2 g de extracto de levadura, 1 g de Trypton, 1 g de NaCl en 500 ml de agua desionizada)] y se incubaron por 24 horas a 65°C bajo fuerte agitación (150 rpm). A continuación se inocularon 100 ml de medio Tt con el cultivo previo y se incubaron a 65°C bajo fuerte agitación. Se añadió a cada cultivo β -ionona (107 μ l/ml de cultivo) después de 24 horas. Se continuó el cultivo por 78 horas. A continuación se separaron las células por centrifugación y se extrajo el sobrenadante con dietiléter. Se analizó el extracto mediante GC y TLC. Se produjeron y analizaron cultivos de control sin sustrato bajo las mismas condiciones.

10 PROTOCOLO DE SECUENCIA

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Nuevas citocromo P450 monooxigenasas termófilas

<130> M/41524

<590>

15 <141>

<160> 10

<170> Patente en Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1170

20 <212> ADN

<213> *Thermus thermophilus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1170)

25 <400> 1

ES 2 382 027 T3

```

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc 48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
  1           5           10           15

cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc 96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
          20           25           30

cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac 144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
          35           40           45

ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc 192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
          50           55           60

acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc 240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
          65           70           75

acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac 288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
          85           90           95

ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag 336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
          100           105           110

gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg 384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
          115           120           125

gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc 432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
          130           135           140

ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc 480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala

```

ES 2 382 027 T3

145	150	155	160	
ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac				528
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp				
	165	170	175	
ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc				576
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg				
	180	185	190	
gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac cgg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga				624
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg				
	195	200	205	
gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag				672
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu				
	210	215	220	
acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc				720
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg				
	225	230	235	240
ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc				768
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala				
	245	250	255	
gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc				816
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr				
	260	265	270	
cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg				864
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro				
	275	280	285	
ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc				912
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe				
	290	295	300	
ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg				960
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly				
	305	310	315	320
acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc				1008
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys				
	325	330	335	
ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc				1056
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala				
	340	345	350	
ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc				1104
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu				
	355	360	365	
gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg				1152
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg				
	370	375	380	
gag gag gtg cgg gcg tga				1170
Glu Glu Val Arg Ala				
	385	390		

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

5 <213> Thermus thermophilus

<400> 2

ES 2 382 027 T3

Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15
 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30
 Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45
 Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60
 Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95
 Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110
 Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125
 Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
 130 135 140
 Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
 145 150 155 160
 Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
 165 170 175
 Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg
 180 185 190
 Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
 195 200 205
 Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
 210 215 220
 Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg
 225 230 235 240
 Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
 245 250 255
 Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
 260 265 270
 Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
 275 280 285
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
 305 310 315 320
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
 325 330 335
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
 340 345 350
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
 355 360 365
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
 370 375 380
 Glu Glu Val Arg Ala
 385

<210> 3

<211> 1188

5 <212> ADN

ES 2 382 027 T3

<213> secuencia sintética

<220>

<221> rasgos misc

<222> (4) .. (21)

5 <223> tag His

<220>

<223> descripción de la secuencia sintética: terminal en N con tag his

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1188)

<400> 3

```

atg cat cac cat cat cat ccc aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg 48
Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
   1                               5                               10                               15

ccc tac ctg aaa gac ctc cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg 96
Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
   20                               25                               30

tgg ggc cgg gcc cac ccc cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc 144
Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
   35                               40                               45

ctg gcc ctg atc ttt gac ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc 192
Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala
   50                               55                               60

gag ggg acc acc aag gcc acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc 240
Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu
   65                               70                               75                               80

acg ggg agg gcc ctc ctc acc gac tgg qgg gaa agc tgg aag gag gcg 288
Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala
   85                               90                               95

```

ES 2 382 027 T3

cgc aag gcc ctc aaa gac ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac 336
 Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr
 100 105 110

cgg gag gcc atg gag gag gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg 384
 Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg
 115 120 125

ggg gag gag cgg gac ctg gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc 432
 Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

etc ctc ggg cgg gcc ctc ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg 480
 Leu Ser Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala
 145 150 155 160

gag cac gcc ctt aag gcc ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc 528
 Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser
 165 170 175

ccc ctg gcc ctc ctg gac ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac 576
 Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp
 180 185 190

cgg ggg gcc ctc tac cgc gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc 624
 Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro
 195 200 205

etc tcc cac ctt ccc cga gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc etc 672
 Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu
 210 215 220

ctg gtg gcg ggc cac gag acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt 720
 Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe
 225 230 235 240

ctc ctc ctc tcc cac cgc ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc 768
 Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
 245 250 255

gag gag gcg gcc ctc gcc gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc 816
 Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
 260 265 270

ccc gcc tgg atc ctc acc cgg agc ctg gaa agc ccc ctc ctc ctg gga 864
 Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
 275 280 285

gag gac cgg ctc ccc ccg gcc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg 912
 Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
 290 295 300

acc cag agg ctc cac ttc ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc 960
 Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
 305 310 315 320

ttc ctg gag gaa agc ggg acc cct tcc ggg cgc tac ttc ccc ttt gcc 1008
 Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
 325 330 335

ctg ggg cag agc ctc tgc ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag gcc 1056
 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
 340 345 350

ES 2 382 027 T3

```

ccc atc gtc ctc agg gcc ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc 1104
Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
      355                360                365

ccc ttc ccc cgg gtc ctc gcc caq gtc acc ctg aag ccc gaa ggc ggg 1152
Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
      370                375                380

ctt ccc ggc cgg cct agg gag gag gtg cgg gcg tga 1188
Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
      385                390                395

```

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<223> descripción de la secuencia artificial: terminal en N con tag his

<400> 4

```

Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
 1      5      10      15

Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
      20      25      30

Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
      35      40      45

Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala
      50      55      60

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

Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala
      85      90      95

Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr
      100     105     110

Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg
      115     120     125

Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg
      130     135     140

Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala
      145     150     155     160

Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser
      165     170     175

Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp
      180     185     190

Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro
      195     200     205

Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu
      210     215     220

```

ES 2 382 027 T3

```

Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe
225                               230                               235                               240
Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
245                               250                               255
Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
260                               265                               270
Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
275                               280                               285
Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
290                               295                               300
Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
305                               310                               315                               320
Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
325                               330                               335
Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
340                               345                               350
Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
355                               360                               365
Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
370                               375                               380
Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
385                               390                               395

```

<210> 5

<211> 1188

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> rasgos misc.

<222> (1168)..(1185)

<223> Tag His

10 <220>

<223> descripción de la secuencia artificial: terminal en C con tag His

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

15 <400> 5

```

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gac tgg ccc tac ctg saa qac ctc      48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
  1                               5                               10                               15
cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcc tgg gcc cgg gcc cac ccc      96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
  20                               25                               30

```

ES 2 382 027 T3

cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac	144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
15 40 45	
ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc	192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50 55 60	
acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc	240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65 70 75 80	
acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac	288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85 90 95	
ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc gcc tac cgg gag gcc atg gag gag	336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100 105 110	
gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg	384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu	
115 120 125	
gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc	432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	
130 135 140	
ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc	480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala	
145 150 155 160	
ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac	528
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp	
165 170 175	
ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc	576
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg	
180 185 190	
gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cae ceg ccc ctc tcc cae ctt ccc cga	624
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg	
195 200 205	
gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag	672
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu	
210 215 220	
acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc	720
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg	
225 230 235 240	
ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc	768
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala	
245 250 255	
gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc	816
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr	
260 265 270	
cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg	864
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro	
275 280 285	

ES 2 382 027 T3

```

ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc 912
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
290 295 300

ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg 960
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
305 310 315 320

acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc 1008
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
325 330 335

ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc 1056
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
340 345 350

ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc 1104
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
355 360 365

gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg 1152
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
370 375 380

gag gag gtg cgg gcg cat cac cat cat cat cac tga 1188
Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His
385 390 395

```

<210> 6

<211> 395

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<223> descripción de la secuencia artificial: terminal en C con tag His

<400> 6

```

Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80

Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125

Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu

```

ES 2 382 027 T3

130						135						140			
Phe	Gly	Lys	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Glu	His	Ala	Leu	Lys	Ala
145					150					155				160	
Leu	Asp	Arg	Ile	Met	Ala	Gln	Thr	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp
				165					170					175	
Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Asp	Arg	Gly	Ala	Leu	Tyr	Arg
			180					185					190		
Glu	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Val	His	Pro	Pro	Leu	Ser	His	Leu	Pro	Arg
		195					200					205			
Glu	Arg	Ala	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	His	Glu
	210					215					220				
Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Trp	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Arg
225					230					235					240
Pro	Asp	Trp	Gln	Lys	Arg	Val	Ala	Glu	Ser	Glu	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala
				245				250						255	
Ala	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Trp	Ile	Leu	Thr
			260					265					270		
Arg	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Asp	Arg	Leu	Pro	Pro	
		275				280					285				
Gly	Thr	Thr	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Thr	Gln	Arg	Leu	His	Phe
	290					295					300				
Pro	Asp	Gly	Glu	Ala	Phe	Arg	Pro	Glu	Arg	Phe	Leu	Glu	Glu	Arg	Gly
305					310					315					320
Thr	Pro	Ser	Gly	Arg	Tyr	Phe	Pro	Phe	Gly	Leu	Gly	Gln	Arg	Leu	Cys
				325					330					335	
Leu	Gly	Arg	Asp	Phe	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Pro	Ile	Val	Leu	Arg	Ala
			340					345					350		
Phe	Phe	Arg	Arg	Phe	Arg	Leu	Asp	Pro	Leu	Pro	Phe	Pro	Arg	Val	Leu
		355				360						365			
Ala	Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Pro	Glu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Pro	Arg
	370					375					380				
Glu	Glu	Val	Arg	Ala	His										
385					390										395

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: cebador PC:R

<400> 7

cgaagctcat atgaagcgcc tttcctgag 30

10 <210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: cebador PCR

<400> 8

gccaattcac gccgcacct cctccctagg 30

<210> 9

5 <211> 42

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: cebador PCR

10 <900> 9

cgaagctcat atgcatcacc atcatcatca caagcgctt tc 42

<210> 10

<211> 42

<212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: cebador PCR

<400> 10

cgaattcag tgatgatgat ggtgatgctc ccgcacctcc tc 42

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Citocromo P450 monooxigenasa, **caracterizada porque** ella exhibe una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:2, así como equivalentes funcionales de ella los cuales se diferencian de SEQ ID NO:2 por 1 a 30 adiciones, sustituciones, borrados y/o inversiones de aminoácidos y donde la modificación de la secuencia, determinada mediante el empleo del sustrato de referencia β -ionona, no cambia la actividad de la monooxigenasa en más de \pm 90%, donde la actividad es determinada bajo condiciones estandarizadas, es decir 0,1 a 0,5 M del sustrato, pH = 6 a 8 y T = 60 -70°C.
2. Citocromo P450 monooxigenasa según la reivindicación 1 de bacterias del género *Thermus* sp..
3. Citocromo P450 monooxigenasa según la reivindicación 2, de una bacteria de la especie *Thermus thermophilus*.
4. Polinucleótido, que codifica para una citocromo P450 monooxigenasa termoestable según una de las reivindicaciones 1 a 3, así como el polinucleótido complementario para ello.
5. Polinucleótido según la reivindicación 4 con una secuencia de ácidos nucleicos según SEQ ID NO: 1, así como la secuencia de ácidos nucleicos complementaria para ello.
6. Cinta de expresión que incluye al menos una secuencia reguladora de ácidos nucleicos enlazada de modo operativo con un polinucleótido según una de las reivindicaciones 4 o 5.
7. Vector recombinante que porta un polinucleótido según una de las reivindicaciones 4 o 5 o una cinta de expresión según la reivindicación 6.
8. Microorganismo recombinante, transformado o transfectado con al menos un vector recombinante según la reivindicación 7.
9. Método para la producción de una citocromo P450 monooxigenasa termoestable según una de las reivindicaciones 1 a 3, donde se cultiva un microorganismo recombinante según la reivindicación 8, el cual produce la citocromo P450 monooxigenasa termoestable y se aísla la monooxigenasa del cultivo.
10. Método para la oxidación microbiológica de un compuesto orgánico elegido de entre cicloalcanos y cicloalquenos dado el caso sustituidos, donde este compuesto reacciona con al menos una citocromo P450 monooxigenasa según una de las reivindicaciones 1 a 3.
11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado porque**
- a1) se cultiva un microorganismo recombinante según la reivindicación 8 en un medio de cultivo en presencia del compuesto orgánico exógeno o formado intermedio elegido dado el caso entre cicloalcanos y cicloalquenos sustituidos, el cual es un sustrato de la monooxigenasa; o
- a2) se incuba un medio de reacción que contiene sustrato con una citocromo P450 monooxigenasa según una de las reivindicaciones 1 a 3; y
- b) se aísla del medio el producto de oxidación o un producto de reacción del mismo.
12. Método según la reivindicación 11, **caracterizado porque** se ejecuta la oxidación mediante cultivo de los microorganismos en presencia de oxígeno a una temperatura de cultivo de por lo menos aproximadamente 20°C y un valor de pH de aproximadamente 6 a 9.
13. Método según la reivindicación 11, **caracterizado porque** como sustrato exógeno se añade en un medio al menos un compuesto elegido de entre cicloalcanos y cicloalquenos dado el caso sustituidos y se ejecuta la oxidación mediante reacción enzimática del medio que contiene sustrato en presencia de oxígeno a una temperatura de por lo menos aproximadamente 20°C y un valor de pH de aproximadamente 6 a 9, donde el medio que contiene sustrato contiene además, referido al sustrato, un exceso molar de aproximadamente 10 a 100 veces en equivalentes de reducción.
14. Birreactor, que incluye una enzima según una de las reivindicaciones 1 a 3 o un microorganismo recombinante según la reivindicación 8, en forma inmovilizada.

15. Empleo de una citocromo P450 monooxigenasa según una de las reivindicaciones 1 a 3, de un vector según la reivindicación 7, o de un microorganismo según la reivindicación 8, para la oxidación microbológica de cicloalcanos y cicloalquenos dado el caso sustituidos.

Fig. 1

```

P450 BM3      TIKEMPQPKTFGELKNLPLNLTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLIKE 60
P450 thermus  -MKRLSLREAWPYLKDLQQD----PLAVLLAWGRAHPRLFLPLPRFPLALIFDPE-GVEG 54
               :*...  ::  **:*      * :.*: .   .:* .   ::  :...  ::

P450 BM3      ACDESREFDKNLSQALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKAHNILLPSFSQQAMKGYHAMMV 120
P450 thermus  ALLAEGTTKATFQYRALSR-LTGRGLLTDWG--ESWKEARKALKDPFLPKNVRGYREAME 111
               * .   *   *   : * :.* **:*.* . :.***:.* : * . * : :.*: *

P450 BM3      DIAVQLVQKWERLNADEHIEVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFNSFYRDQPHPFITSMVRA 180
P450 thermus  EEARAFGEWR----GEERDLDHEMLALSRLLLGRALFGKPLSPSLAEH-----ALKA 160
               : *  . :.* .*. :. :.* **:* * * . * . . . . :. :. :.*

P450 BM3      LDEAMNKLQRANPDDPAYDENKRFQEDIKVMNDLVDKI IADRKASGEQSDDLTHMLNG 240
P450 thermus  LDRIMAQTR--SPLALLDLAAEARFR-----K--DRGALYREAEALIVHPPLS 204
               **. * : : . *      : :.*      * * * . . . : * : * .

P450 BM3      KDPETGEPLDDENIRYQIITFLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEAAARVLD 300
P450 thermus  HLP-----RERALSEAVTLLVAGHETVASALTWSFLLLSHRPDWQKRAESEEAAALAA 257
               : *      * .   : :.*:***. . . * : : . : * . . :.*. .*.

P450 BM3      PVPSYKQVKQLKYVGMVLNEALRLWPTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDELMVLIPO 360
P450 thermus  -----FQEALRLYPPAWILTRRLERPLLLG-EDRLPPG-TTLVLSPYV 298
               :*****:*.* :. :. :. : * * * * * : * * * :

P450 BM3      HRDKTIWGDDVEEFRPERFENPSAIPQHAFKPFNGQRACIGQOFALHEATLVLGMMMLKH 420
P450 thermus  TQRLHFP--DGEAFRPERFLEERGTPSGRYFPFGLGQRLCLGRDFALLEGFIVLRAFFRR 356
               : :   * * * * * : . * . : * * * * * * : : * * * * . : * * : : :

P450 BM3      FDFEDHTNYELDIKETLTLKPEGFVVKAKSKKIPLGGIPS-PSTEQSAKKVR 471
P450 thermus  FRLDPLP--FPRVLAQVTLRPE-----GGLPARPREEVRA---- 389
               * :. .   : : **:*      **:* : * * *
    
```

Fig.2

