

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 945**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 35/00 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2005 E 05801289 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1799817**

54 Título: **Expandasas mutantes**

30 Prioridad:

13.10.2004 EP 04105022

12.07.2005 EP 05106347

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.02.2013

73 Titular/es:

**DSM SINOCHEM PHARMACEUTICALS
NETHERLANDS B.V. (100.0%)
Alexander Fleminglaan 1
2613 AX Delft, NL**

72 Inventor/es:

**SCHIPPER, DICK;
KERKMAN, RICHARD;
RAAMSDONK, LOURINA, MADELEINE;
BOVENBERG, ROELOF, ARY, LANS;
JENNE, STEPHANE J.;
CHEN, YAN;
CHEN, YONG HONG;
GAO, XIAODONG;
KREBBER, ANKE;
KREBBER, CLAUS;
TO LA CHING, CHARLENE y
TOBIN, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 395 945 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

Expandasas mutantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a enzimas expandasas mutantes, a polinucleótidos que codifican tales enzimas, a microorganismos transformados con dichos polinucleótidos que codifican dichas enzimas expandasas mutantes, y al uso de tales enzimas expandasas mutantes o tales microorganismos en la expansión anular del ácido 5-carboxipentanoil-6-aminopenicilánico (adipil-6-APA = ad-6-APA).

Antecedentes de la invención

10 Los antibióticos beta-lactámicos constituyen el grupo más importante de compuestos antibióticos con una larga historia de uso clínico. Entre este grupo, los sobresalientes son las penicilinas y cefalosporinas. Las penicilinas se producen de forma natural por diversos hongos filamentosos tales como *Penicillium* (por ejemplo *P. chrysogenum*). Las cefalosporinas son producidas de forma natural por diversos microorganismos tales como *Acremonium* (por ejemplo *A. chrysogenum*) y *Streptomyces* (por ejemplo *Streptomyces clavuligerus*).

15 Como resultado de técnicas de mejora de cepas clásicas, los niveles de producción de los antibióticos en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* han aumentado notablemente durante las últimas décadas. Con el conocimiento creciente de las rutas biosintéticas que conducen a penicilinas y cefalosporinas, y el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante, ahora hay disponibles nuevas herramientas para la mejora de cepas de producción.

20 Se ha identificado a la mayoría de las enzimas implicadas en la biosíntesis de β -lactama, y se han clonado sus genes correspondientes, como se puede encontrar en Ingolia y Queener, Med Res Rev (1989) 9:245-264 (ruta biosintética y enzimas), y Aharonowitz, Cohen, y Martin, Ann Rev Microbiol (1992) 46:461-495 (clonación de genes).

Las dos primeras etapas en la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* son la condensación de los tres aminoácidos ácido L-5-amino-5-carboxipentanoico (ácido L- α -aminoadípico) (A), L-cisteína (C) y L-valina (V) en el tripéptido LLD-ACV, seguido de la ciclación de este tripéptido para formar isopenicilina N. Este compuesto contiene la estructura típica de β -lactama.

25 La tercera etapa implica la sustitución de la cadena lateral hidrófila del ácido L-5-amino-5-carboxipentanoico por una cadena lateral hidrófoba mediante la acción de la enzima aciltransferasa (AT).

30 En el documento EP-A-0448180 se ha descrito que la reacción de intercambio enzimática mediada por AT tiene lugar dentro de un orgánulo celular, el microcuerpo. La observación de que se pueden formar cantidades sustanciales de desacetoxicefalosporina C (DAOC) mediante transformantes de *P. chrysogenum* no pronosticados que expresan desacetoxicefalosporina C sintasa (EC 1.14.20.1 - DAOCS, indicada aquí en lo sucesivo como expandasa) implica la presencia de cantidades significativas de penicilina N, el sustrato natural para la expandasa, en *P. chrysogenum* (Alvi et al., J Antibiot (1995) 48:338-340). Sin embargo, las cadenas laterales de D- α -aminoadípilo de DAOC no se pueden eliminar fácilmente.

35 Las cefalosporinas son mucho más caras que las penicilinas. Una razón es que algunas cefalosporinas (por ejemplo, cefalexina) se obtienen a partir de penicilinas mediante un número de conversiones típicas. Otra razón es que, hasta ahora, sólo se pudieron fermentar cefalosporinas con una cadena lateral de D- α -amino-adípilo. La cefalosporina C, de lejos el material de partida más importante a este respecto, es muy soluble en agua en cualquier pH, implicando así a procesos de aislamiento largos y costosos que usan tecnología en columna engorrosa y cara. La cefalosporina C obtenida de esta manera se ha de convertir en cefalosporinas usadas terapéuticamente mediante un número de conversiones químicas y enzimáticas.

40 Los métodos actualmente favorecidos en la industria para preparar el ácido 7-amino-desacetoxicefalosporánico (7-ADCA) intermedio implican etapas químicas complejas que conducen a la expansión y derivatización de penicilina G. Una de las etapas químicas necesarias para producir 7-ADCA implica la expansión de la estructura anular de penicilina de 5 miembros a una estructura anular de cefalosporina de 6 miembros (véase, por ejemplo, el documento US 4.003.894). Este procesamiento químico complejo es tanto caro como nocivo para el medioambiente.

45 En consecuencia, hay un gran deseo de sustituir tales procesos químicos por reacciones enzimáticas tales como catálisis enzimática, preferiblemente durante la fermentación. Una clave para la sustitución del proceso de expansión química por un proceso biológico es la enzima central en la ruta biosintética de cefalosporinas, la expandasa.

50 Se encontró que la enzima expandasa procedente de la bacteria *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) lleva a cabo, en algunos casos, las expansiones anulares de penicilina. Cuando se introduce en *P. chrysogenum*, puede convertir la estructura anular de penicilina en la estructura anular de cefalosporina, como se describe en Cantwell et al., Proc R Soc Lond B (1992) 248:283-289. La enzima expandasa se ha caracterizado bien (documento EP-A-0366354) tanto bioquímica como funcionalmente, y tiene su gen correspondiente. Se han descrito tanto los mapas físicos del gen *cefE* (el gen que codifica la enzima expandasa de *S. clavuligerus* - documento EP-A-0341892), la

secuencia de ADN y estudios de transformación en *P. chrysogenum* con *cefE*. La secuencia de ADN y de aminoácidos de la enzima expandasa de *S. clavuligerus* se representan en SEC ID NO 1.

Otra fuente para una enzima expandasa es la bacteria *Nocardia lactamdurans* (*N. lactamdurans*, antiguamente *S. lactamdurans*). Se han descrito tanto las propiedades bioquímicas de la enzima como la secuencia de ADN del gen que codifica la enzima – véanse Cortes et al., J Gen Microbiol (1987) 133:3165-3174 y Coque et al., Mol Gen Genet (1993) 236:453-458, respectivamente. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la enzima expandasa de *N. lactamdurans* se representan en SEC ID NO 2.

Recientemente, se han encontrado nuevos genes (*cefE*) y enzimas expandasas en *Streptomyces jumonjinensis*, *Streptomyces ambofaciens* y *Streptomyces chartreuses* - véase Hsu et al. (2004), Appl. and Environm. Microbiol. 70, 6257-6263. La Tabla 1 resume las identidades de secuencias de aminoácidos de varias expandasas, y muestra que las identidades de secuencias oscilan de 67 a 85%, dependiendo de la fuente de la enzima.

Tabla 1: Identidades de secuencias de aminoácidos de varias expandasas (datos tomados de Hsu et al.).

Fuente	<i>S. clavuligerus</i>	<i>S. jumonjinensis</i>	<i>S. ambofaciens</i>	<i>S. chartreuses</i>	<i>N. lactamdurans</i>
<i>S. clavuligerus</i>	100				
<i>S. jumonjinensis</i>	81	100			
<i>S. ambofaciens</i>	81	85	100		
<i>S. chartreuses</i>	76	77	79	100	
<i>N. lactamdurans</i>	70	68	70	67	100

En la biosíntesis de cefalosporinas, que tiene lugar principalmente en células procariotas, la desacetoxicefalosporina C se convierte subsiguientemente en desacetilcefalosporina C mediante la enzima desacetilcefalosporina C sintasa, también denominada desacetoxicefalosporina C hidroxilasa o hidroxilasa (EC 1.14.11.26 - DACS). Los genes que codifican tales hidroxilasas se denominan genes *cefF* (por ejemplo, véase Hsu et al.). La expandasa encontrada en células eucariotas, por ejemplo *Acremonium chrysogenum*, puede catalizar la conversión directa de penicilina N en desacetoxicefalosporina C debido a la posesión tanto de actividad expandasa como hidroxilasa. Por tanto, el gen codificado se denomina *cefEF* (véase Hsu et al.).

Como se define aquí, el término expandasa se refiere a enzimas expandasas (EC 1.14.20.1, codificadas por genes *cefE*) así como expandasas que poseen también además la actividad de hidroxilasa (EC 1.14.20.1 + EC 1.14.11.26, codificadas por genes *cefEF*).

Puesto que la enzima expandasa cataliza la expansión del anillo de tiazolidina de 5 miembros de penicilina N hasta el anillo de dihidrotiazina de 6 miembros de DAOC, esta enzima sería por supuesto un candidato lógico para sustituir a las etapas de expansión de anillo del proceso químico. Desafortunadamente, la enzima trabaja sobre el intermedio de penicilina N de la ruta biosintética de cefalosporinas, pero no, o muy ineficazmente, sobre las penicilinas baratas ya disponibles como se producen mediante *P. chrysogenum*, como penicilina V o penicilina G. La penicilina N no está comercialmente disponible, e incluso cuando se expande, su cadena lateral de D- α -amino-adipilo no se puede eliminar fácilmente por acilasas penicilínicas.

Se ha dado a conocer que la enzima expandasa es capaz de expandir penicilinas con cadenas laterales particulares hasta el derivado de 7-ADCA correspondiente. Este rasgo de la expandasa se ha explotado en la tecnología como se describe en los documentos EP-A-0532341, WO 95/04148 y WO 95/04149. En estas descripciones, la conversión *in vitro* química convencional de penicilina G en 7-ADCA se ha sustituido por la conversión *in vivo* de ciertos derivados del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) en cepas de *Penicillium chrysogenum* recombinantes transformadas con un gen de expandasa.

Más particularmente, el documento EP-A-0532341 enseña el uso *in vivo* de la enzima expandasa en *P. chrysogenum*, en combinación con una cadena lateral de adipilo (en lo sucesivo denominado adipilo) como materia prima, que es un sustrato para la enzima aciltransferasa en *P. chrysogenum*. Esto conduce a la formación de adipil-6-APA, que se convierte mediante una enzima expandasa introducida en la cepa de *P. chrysogenum* para producir

adipil-7-ADCA. Finalmente, se describe la eliminación de la cadena lateral de adipilo, que produce 7-ADCA como producto final. Además, el documento EP-A-540210 enseña la producción similar de adipil-7-ADAC y adipil-7-ACA.

5 Como enfoque alternativo, en el documento EP0828850 se ha propuesto la expansión de penicilina G usando *P. chrysogenum* transformado con *cefE*. Además, a fin de incrementar la expansión de penicilina G, se ha descrito el uso del gen mutante *cefE* de *S. clavuligerus*. Los documentos US 5.919.680, WO 98/02551, WO 99/33994, WO 01/85951 y EP 1348759 describen todos genes mutantes *cefE* que codifican supuestamente enzimas que tienen una mayor actividad de expandasa sobre penicilina G.

No obstante, estas expandasas mutantes todavía no proporcionan un procedimiento comercialmente atractivo para la producción de cefalosporinas.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar adicionalmente el procedimiento en el que se preparan cefalosporinas a partir de la expansión de adipil-6-APA. Este procedimiento se caracteriza por una eliminación eficiente del material de cadena lateral desde el material central cefalosporínico. Una etapa para mejorar adicionalmente este procedimiento es la mejora de la actividad de expandasa sobre adipil-6-APA.

Descripción de las figuras

- 15 1/3. A y B Alineamiento de aminoácidos de mutantes de expandasas mejoradas; SCLAVEIW representa la secuencia de aminoácidos de expandasa de *S. clavuligerus*; NOCAEIW representa la secuencia de aminoácidos de expandasa de *N. lactamdurans*; para las otras secuencias, la notación es la siguiente: 309EIWIT representa la secuencia de aminoácidos de expandasa de expandasa mutante H309, etc.
- 2/3. Representación esquemática del vector pIATWAn.
- 20 3/3 Análisis mediante HPLC de una mezcla de ensayo de expandasas según el Ejemplo 3
- A. a t = 0 minutos
- B. a t = 30 minutos

Descripción detallada de la invención

25 En un primer aspecto, la invención proporciona una expandasa mutante que es una variante de un polipéptido modelo con actividad de expandasa que tiene la secuencia como se representa en SEC ID NO. 1 o una secuencias de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con SEC ID NO. 1, y mediante la cual la treonina en la posición 89 de aminoácidos en el péptido modelo se ha sustituido por lisina usando la numeración de la posición de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la enzima expandasa como se representa en SEC ID NO. 1.

30 Preferiblemente, la invención proporciona una expandasa mutante, mediante la cual la expandasa mutante tiene una actividad de expandasa *in vitro* mejorada de al menos 2 veces con respecto a adipil-6-APA en comparación con el polipéptido modelo con actividad de expandasa de SEC ID NO. 1. La determinación de la actividad de expandasa *in vitro* con respecto a adipil-6-APA se describe con detalle en los Materiales y Métodos (Ensayo (1)-(3)). Más preferiblemente, la actividad de expandasa *in vitro* frente a adipil-6-APA de la expandasa mutante está mejorada al menos 2,5 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces,

35 más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 9 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 11 veces.

40 En algunas de las enzimas expandasas mutantes descritas aquí, partes de la secuencia de aminoácidos de la expandasa de *S. clavuligerus* se han sustituido por partes correspondientes de la secuencia de aminoácidos de expandasa de *N. lactamdurans*. La secuencia de aminoácidos del gen *CefE* de la cepa ATCC27382 de *N. lactamdurans* se representa en SEC ID NO: 2.

En la descripción de estas expandasas mutantes, los aminoácidos se numeran según la numeración de las partes homólogas de la secuencia de aminoácidos de la expandasa de *S. clavuligerus*. La homología de las secuencias de aminoácidos de las expandasas de *S. clavuligerus* y *N. lactamdurans* se deriva a partir de la Figura 1 y Tabla 1.

45 Con "expandasa alterada o mutante" se quiere decir, en el contexto de la presente invención, cualquier enzima que tenga actividad de expandasa, que no se ha obtenido a partir de una fuente natural y para la cual la secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de aminoácidos completa de las enzimas expandasas naturales de *S. clavuligerus* y *N. lactamdurans*.

50 La invención también proporciona una expandasa mutante que se modifica adicionalmente al menos en una posición de aminoácido seleccionada del grupo 1 que consiste en las posiciones 2, 18, 59, 73, 74, 89, 90, 99, 101, 105, 112, 113, 155, 170, 177, 209, 213, 217, 244, 249, 251, 277, 278, 280, 281, 284, 293, 300, 307 y 311 usando la numeración de la posición de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la enzima expandasa codificada por el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*. La secuencia nucleotídica del gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, así como la secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen *cefE*, se representan en SEC ID NO: 1. Más

preferiblemente, la expandasa mutante se modifica al menos en una posición de aminoácido seleccionada del grupo 2 que consiste en las posiciones 2, 18, 59, 89, 90, 99, 101, 105, 112, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280, 284 y 293. La expandasa mutante también puede haber sido modificada al menos en una posición de aminoácido seleccionada del grupo 1 que no forma parte del grupo 2, junto con al menos una posición de aminoácido seleccionada del grupo 2.

La modificación en una posición de aminoácido puede comprender una sustitución por otro aminoácido, seleccionado del grupo de 20 L-aminoácidos que aparecen en la naturaleza – véase la Tabla 2. Como alternativa, la modificación en una posición de aminoácido puede comprender una supresión del aminoácido en dicha posición. Además, la modificación en una posición de aminoácido puede comprender una sustitución de uno o más aminoácidos en el lado C-terminal o N-terminal de dicho aminoácido.

Tabla 2

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

El polipéptido modelo con actividad de expandasa, como se usa en la presente invención, se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido con actividad de expandasa, que tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos según SEC ID NO: 1, y polipéptidos con actividad de expandasa que tienen una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad con SEC ID NO: 1 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferible al menos 95%, tal como las enzimas expandasas que se resumen en la Tabla 1. El más preferido como polipéptido modelo con actividad de expandasa como se usa en la presente invención es un polipéptido con actividad de expandasa que tiene la secuencia de aminoácidos según SEC ID NO:1 o que tiene la secuencia de aminoácidos según SEC ID NO: 2.

Las expandasas mutantes descritas aquí tienen modificaciones en al menos

ES 2 395 945 T3

- 2 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 89, 277, 281 y 300, más preferiblemente en las posiciones 2+281 ó 89+281 ó 277+300.
- 3 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 89, 281, 293 y 311, más preferiblemente en las posiciones 2+89+281 ó 89+281+311 ó 89+281+293.
- 5 ○ 4 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 73, 89, 90, 217, 244, 277, 280, 281, 306, 307 y 311, más preferiblemente en las posiciones 2+277+280+281 ó 2+281+307+311 ó 73+89+281+311 ó 89+217+281+311 ó 89+244+281+311 ó 89+281+307+311 ó 277+281+306+311 ó 89+281+306+311 ó 90+281+306+311.
- 10 ○ 5 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 73, 89, 90, 155, 213, 249, 278, 281, 293, 300, 306, 307 y 311, más preferiblemente en las posiciones 2+89+281+306+311 ó 2+155+281+306+311 ó 73+89+213+281+311 ó 89+78+218+307+311, 89+281+293+300+311 ó 89+249+281+307+311.
- 6 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 90+105+113+281+306+311.
- 15 ○ 7 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 73, 89, 105, 113, 155, 170, 177, 251, 277, 280, 281, 293, 300, 306, 307 y 311, más preferiblemente en 73+89+281+293+300+307+311 ó 105+113+155+177+281+306+311 ó 155+177+277+280+281+306+311.
- 8 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 89, 90, 99, 105, 113, 155, 177, 277, 281, 307 y 311 más preferiblemente en 2+90+99+105+113+281+306+311 ó 2+90+105+113+155+177+277+281
- 20 ○ 9 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2+90+105+113+155+177+281+306+311.
- 10 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 59, 90, 101, 105, 113, 155, 177, 209, 277, 281, 307 y 311 más preferiblemente en 2+90+105+113+155+177+277+281+306+311.
- 25 ○ 11 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 2, 90, 105, 113, 155, 177, 277, 281, 293, 307, 311.

Las sustituciones de algunos de los aminoácidos de expandasa implican preferiblemente la sustitución de:

- 30 • histidina en la posición 18 según SEC ID NO 1 por cisteína, serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, lisina y arginina; más preferiblemente serina, treonina, asparagina, glutamina, lisina y arginina; lo más preferible arginina;
- metionina en la posición 74 según SEC ID NO 4 por treonina o por un aminoácido hidrófobo tal como valina, leucina, isoleucina y fenilalanina, o por un aminoácido anfífilico tal como tirosina, triptófano, histidina, glutamina y asparagina, más preferiblemente treonina o isoleucina;
- 35 • treonina en la posición 89 según SEC ID NO 1 preferiblemente por un aminoácido cargado, preferiblemente un aminoácido cargado negativamente tal como ácido aspártico o ácido glutámico, lo más preferible un aminoácido cargado positivamente tal como lisina, arginina o histidina; siendo lo más preferido lisina;
- serina en la posición 112 según SEC ID NO 1 preferiblemente por treonina;
- histidina en la posición 244 según SEC ID NO 1 por glutamina o asparagina, más preferiblemente glutamina;
- 40 • ácido aspártico en la posición 284 según SEC ID NO 1 y en la posición 285 en SEC ID NO 4 por un aminoácido con una cadena lateral polar tal como serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, histidina, lisina, arginina y tirosina, más preferiblemente asparagina, glutamina, ácido glutámico, lisina y arginina; siendo lo más preferido asparagina;
- 45 • glicina en la posición 300 según SEC ID NO 1 por un aminoácido con un resto pequeño, tal como alanina, serina, treonina, cisteína, valina, isoleucina, leucina, asparagina y ácido aspártico, más preferiblemente valina.

Además, se describen expandasas mutantes que son variantes del grupo que consiste en las expandasas de tipo salvaje de *S. clavuligerus*, *S. jumonjinensis*, *S. ambofaciens*, *S. chartreuses* y *N. lactamdurans*. Las más preferidas son expandasas mutantes como se definen aquí anteriormente que son variantes de la expandasa de tipo salvaje de *S. clavuligerus* o *N. lactamdurans*. Las más preferidas son expandasas mutantes como se definen aquí anteriormente que son variantes de la expandasa de tipo salvaje de *S. clavuligerus*. Las expandasas mutantes preferidas que son mutantes de la expandasa de *Streptomyces clavuligerus* tienen modificaciones en al menos

ES 2 395 945 T3

- 2 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, T89, L277, C281 y G300
- 3 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, T89, C281, T293 y A311
- 5 ○ 4 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, M73, T89, N90, Y217, H244, L277, E280, C281, R306, R307 y A311
- 5 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, M73, T89, N90, C155, T213, R249, A278, C281, T293, R306, R307 y A311
- 10 ○ 6 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N90+T105+G113+C281+R306+A311
- 7 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, M73, T89, T105, G113, C155, H170, P177, D251, L277, E280, C281, T293, G300, R306, R307 y A311
- 8 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, T89, N90, M99, T105, G113, C155, P177, L277, C281, R306, R307 y A311
- 15 ○ 9 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2+N90+T105+G113+C155+P177+C281+R306+A311
- 10 o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, S59, N90, T105, G113, T105, G113, C155, P177, G209, L277, C281, R306, R307, A311
- 20 ○ 11 posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D2, N90, T105, G113, C155, P177, L277, C281, R306, R307, A311.

Las modificaciones preferidas en las posiciones respectivas son D2N, D2H, D2Y, S59G, M73H, M73I, T89A, T89K, T89V, N90W, N90S, M99T, T105I, Y101F, G113D, C155W, H170Y, P177L, G209A, T213A, Y217H, H244R, R249C, D251G, L277Q, L277T, A278V, E280G, C281Y, T293K, G300S, R306supresión, R307supresión, R370T y A311D. En esta notación, la letra que sigue al número representa el aminoácido (código de una letra) presente en la expandasa mutante. La supresión en la posición R306 o R307 significa que la arginina original en la posición 306 ó 307 ya no está presente en la expandasa mutante. Las expandasas mutantes muy preferidas son las expandasas mutantes que se resumen en la Tabla 3.

Preferiblemente, las expandasas mutantes descritas aquí tienen una actividad de expandasa mejorada sobre adipil-6-APA como se define aquí anteriormente, y las expandasas mutantes proporcionadas por la presente invención tienen igualmente una actividad de expandasa mejorada sobre Pen-G. Preferiblemente, las expandasas mutantes tienen una actividad de expandasa mejorada tanto sobre adipil-6-APA así como sobre Pen-G. Las expandasas mutantes con una actividad mejorada sobre Pen-G se pueden usar ventajosamente en un procedimiento para la producción de fenilacetil-7-ADCA como se describe posteriormente más abajo.

La presente invención también proporciona expandasas mutantes con una actividad de expandasa disminuida o incluso ausente con isopenicilina N (iPN). Preferiblemente, la actividad de expandasa con adipil-6-APA o Pen-G no se ve afectada, sino más preferiblemente la actividad de expandasa con adipil-6-APA o Pen-G, o con ambos, está mejorada como se define aquí anteriormente. La ventaja de estas expandasas mutantes más preferidas es que la actividad de expandasa disminuida o incluso ausente con isopenicilina N (iPN) da como resultado menos subproducto en un proceso de fermentación para producir ad-7-ADCA o fenilacetil-7-ADCA.

Las expandasas mutantes preferidas tienen una actividad de expandasa disminuida o incluso ausente con isopenicilina N (iPN) como sustrato, opcionalmente combinado con una actividad de expandasa mejorada sobre ad-6-APA como sustrato, y se han modificado en la posición 89 según la numeración de aminoácidos de SEC ID NO 1, con lo que el aminoácido de origen natural se ha sustituido por lisina.

Una expandasa mutante muy preferida se selecciona del grupo que consiste en H101, H106, H111, H122, H127, H262, H301, H305, H308, H309, H401, H402, H403, H501, H502, H503, H504, H505, H506, H507, H508, H601, H602, H603, H604, H605, H606, H607, H608, H609, H650, H651, H652, H653, H654, H655, H656, H657, H658, H659, H660, H661, H662, G601, G602, G603, G604, G605, G606, G607, G608, G609, G610, G611, G613 y G614 (véase la Tabla 3).

En un segundo aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica la expandasa mutante de la presente invención. El polinucleótido que codifica la expandasa mutante según la presente invención puede ser cualquier polinucleótido que codifique la secuencia de aminoácidos apropiada según la invención. Esto implica que puede corresponder al gen *cefE* de *S. clavuligerus*, excepto para los nucleótidos que codifican las modificaciones en las posiciones de aminoácidos respectivas. Como alternativa, el polinucleótido de la invención puede comprender una secuencia codificante en la que el uso de codones para los diversos aminoácidos se desvía del uso de codones

en *S. clavuligerus* y/o en *N. lactamdurans*. Por ejemplo, el uso de codones se puede adaptar al uso de codones de una célula hospedante particular, que se transformará o se ha transformado con el fragmento de ADN que codifica la expandasa alterada.

5 En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de expresión o casete de expresión que comprende el polinucleótido de la invención como se define aquí anteriormente.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula transformada, transformada con el polinucleótido de la invención o el vector de expresión o casete de expresión de la invención. La célula hospedante transformada se puede usar para la producción de la expandasa mutante de la invención, o la célula hospedante se puede usar para la producción de un compuesto beta-lactámico de interés.

10 Las células hospedantes para la producción de la expandasa mutante de la invención son preferiblemente células hospedantes que son conocidas en la técnica por su producción eficiente de proteínas o enzimas, ya sea extracelular o intracelularmente, por ejemplo microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias. Los ejemplos de células hospedantes preferidas comprenden, pero no se limitan a, los siguientes géneros: *Aspergillus* (por ejemplo *A. niger*, *A. oryzae*), *Penicillium* (por ejemplo *P. emersonii*, *P. chrysogenum*), *Saccharomyces* (por ejemplo *S. cerevisiae*), *Kluyveromyces* (por ejemplo *K. lactis*), *Bacillus* (por ejemplo *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*), *Escherichia*, (*E. coli*), *Streptomyces* (por ejemplo *S. clavuligerus*).

15 Las células hospedantes para la producción de un compuesto beta-lactámico de interés son preferiblemente células hospedantes que son conocidas en la técnica por su producción eficiente de compuestos beta-lactámicos. Los ejemplos de células hospedantes preferidas comprenden, pero no se limitan a, los siguientes géneros: especies de *Penicillium* (por ejemplo *P. chrysogenum*), *Acremonium* (por ejemplo *A. chrysogenum*), *Streptomyces* (por ejemplo *S. clavuligerus*), *Nocardia* (por ejemplo *N. lactamdurans*), *Lysobacter* (por ejemplo *L. lactamgenus*) y *Flavobacterium*.

20 En un quinto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de la expandasa mutante de la invención, que comprende cultivar la célula hospedante transformada según la invención en condiciones que conduzcan a la producción de la expandasa mutante, y, opcionalmente, recuperar la expandasa mutante. La expandasa mutante recuperada se puede usar ventajosamente en un procedimiento *in vitro* para producir una cefalosporina deseada a partir de una penicilina correspondiente, por ejemplo la expandasa mutante recuperada se puede usar en un procedimiento para producir fenilacetil-7-ADCA a partir de Pen-G, o adipil-7-ADCA a partir de adipil-6-APA.

25 En un sexto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un compuesto beta-lactámico de interés, que comprende cultivar la célula hospedante transformada según la invención en condiciones que conduzcan a la producción del compuesto beta-lactámico de interés, y, opcionalmente, recuperar el compuesto beta-lactámico. Los compuestos beta-lactámicos preferidos pertenecen al grupo de cefalosporinas tales como fenilacetil-7-ADCA, adipil-7-ADCA, adipil-7-ADAC y adipil-7-ACA. En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para la producción de fenilacetil-7-ADCA o adipil-7-ADCA cultivando una cepa seleccionada de *Penicillium chrysogenum*, que se ha transformado con un polinucleótido seleccionado de la invención que codifica una expandasa mutante de la invención. Para la producción de fenilacetil-7-ADCA, se selecciona una expandasa mutante que tiene un factor de mejora elevado sobre Pen-G como sustrato. Para la producción de adipil-7-ADCA, se selecciona una expandasa mutante que tiene un factor de mejora elevado sobre ad-6-APA como sustrato.

30 En otra realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para la producción de 7-ADCA, que comprende el procedimiento para la producción de fenilacetil-7-ADCA o adipil-7-ADCA como se describe aquí anteriormente, seguido de tras la purificación opcional de dichos derivados de 7-ADCA, una etapa del procedimiento en la que la cadena lateral de fenilacetilo o de adipilo de fenilacetil-7-ADCA y de adipil-7-ADCA, respectivamente, se separa por escisión generando de ese modo 7-ADCA y el ácido de cadenas laterales liberado. Dicha escisión se puede obtener por medios químicos o, más preferiblemente, de forma enzimática usando una enzima acilasa. Las acilasas adecuadas para la escisión de la cadena lateral de adipilo son obtenibles a partir de diversas especies de *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas SY-77* o *Pseudomonas SE-83*. Las acilasas adecuadas para la escisión de las cadenas laterales de fenilacetilo son las acilasas penicilínicas de *Escherichia coli* o *Alcaligenes faecalis*.

35 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de una cefalosporina a partir de una penicilina correspondiente, mediante el cual la expansión del anillo tiazolidínico de 5 miembros de la penicilina al anillo dihidrotiazínico de 6 miembros de la cefalosporina se produce en un procedimiento *in vitro*, catalizado por una expandasa mutante de la invención. En un procedimiento preferido, adipil-6-APA se expande al adipil-7-ADCA correspondiente por una expandasa mutante de la invención, preferiblemente una expandasa mutante que tiene un factor de mejora elevado sobre adipil-6-APA como sustrato. En otro procedimiento preferido, Pen-G se expande al fenilacetil-7-ADCA correspondiente mediante una expandasa mutante de la invención, preferiblemente una expandasa mutante que tiene un factor de mejora elevado sobre Pen-G como sustrato.

40 El procedimiento puede estar seguido por, tras la purificación opcional de dichos derivados de 7-ADCA, una etapa del procedimiento en la que las cadenas laterales de adipil-7-ADCA y fenilacetil-7-ADCA son separadas por escisión, generando de ese modo 7-ADCA y el ácido de cadenas laterales liberado – véase más arriba.

El producto final deseado, 7-ADCA, se puede recuperar según métodos conocidos en la técnica que implican la escisión química o enzimática de la cadena lateral de adipil-7-ADCA o fenilacetil-7-ADCA, y opcionalmente el 7-ADCA resultante se puede purificar y/o cristalizar adicionalmente.

5 La clonación del gen que codifica un polipéptido modelo con actividad de expandasa se puede llevar a cabo según métodos conocidos en la técnica.

10 Los polipéptidos modelo preferidos con actividad de expandasa se seleccionan del grupo que consiste en un polipéptido con actividad de expandasa obtenible de *Streptomyces clavuligerus*, preferiblemente que tienen una secuencia de aminoácidos según SEC ID NO: 1, y polipéptidos con actividad de expandasa que tienen una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad con SEC ID NO: 1 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferible al menos 95%, tal como las enzimas expandasas que se resumen en la Tabla 1.

Se puede emplear cualquier técnica de mutagénesis que dé como resultado mutaciones sobre todo el gen. Las técnicas adecuadas son PCR (reacción en cadena de la polimerasa) propensa a error (EP), y/o usando PCR con cebadores saturados específicos de la mutación (sMPP) exactamente según del documento WO 03/010183.

15 **Materiales y Métodos**

1. General

Los oligonucleótidos se sintetizaron por Invitrogen (Carlsbad CA, US).

La secuenciación del ADN se llevó a cabo por SEQLAB (Göttingen, Alemania) o por Baseclear (Leiden, Países Bajos).

20 Las enzimas de restricción se adquirieron de Invitrogen.

Los ensayos proteicos se llevaron a cabo según el método descrito por Bradford, M.M. (1976) Anal Biochem. 72:248-54.

Las células competentes ElectroMAX de *Escherichia coli* DH10B se obtuvieron de Invitrogen. El protocolo fue suministrado por el fabricante.

25 La electroforesis en SDS-PAGE se llevó a cabo en el sistema suministrado por Invitrogen. NuPAGE Novex Bis-Tris Gels (Invitrogen). SimplyBlue SafeStain Microwave protocol.

Resumen de los constructos usados

Plásmido	Descripción
PBAD-MH-Zeo-MBP-ScEwt	Constructo de expresión en <i>E. coli</i> , inducible por arabinosa, con proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada a expandasa de <i>S. clavuligerus</i> de tipo salvaje. Marcador de zeocina
PBAD-MH-Zeo-MBP-H127	Igual pero fusionado a expandasa H127 (véase también la Tabla 3x)
PBAD-MH-Zeo-MBP-H406	Igual pero fusionado a expandasa H406 (véase también la Tabla 3x)
PBAD-MH-Zeo-MBP-H402	Igual pero fusionado a expandasa H402 (véase también la Tabla 3x)
PBAD-MH-Zeo-MBP-H403	Igual pero fusionado a expandasa H403 (véase también la Tabla 3x)

1. Clonación de los vectores de expresión de *E. coli*

30 El producto de fusión se liga en el vector pBAD/MH MBP-ScEwt Dest zeo mediante digestión con *EcoRI/SalI*. Esto sustituye el gen de expandasa de tipo salvaje por los genes de la librería. Para evitar números significativos de constructos de tipo salvaje, los constructos de la ligación se digirieron con *SmaI*.

2. Construcción de las librerías

La transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación produjo librerías de aproximadamente 12.000-13.000 colonias. Para ensayar la calidad de las librerías, se seleccionó un conjunto aleatorio de colonias, y los constructos se digirieron con enzimas de restricción. Esto mostró que aproximadamente el 26% de la librería reveló un patrón aberrante. A continuación, se llevó a cabo el análisis de secuencia sobre 10 clones normales para determinar las frecuencias de mutación. Las secuencias mostraron que estaban presentes tanto mutaciones de saturación como mutaciones propensas a error, en un nivel satisfactorio.

3. Expresión y cribado de expandasas mutantes

3.1. Cribado de la librería de *cefE* en busca de actividad mejorada

Células de *E. coli* TG1 que contienen la librería A se sembraron en placas y se hicieron crecer en placas de agar. Las colonias se aplicaron a través de un robot en placas de microtitulación de 96 pocillos que contienen medio líquido (2YT, 30 µg/ml de cloranfenicol, 0,5% de glucosa), y se hicieron crecer hasta saturación agitando a 37°C. Las células se subcultivaron en placas de megatitulación de 96 pocillos; inóculo 1:40 en 2YT, 30 µg/ml de cloranfenicol, y se indujeron mediante 0,2 mM de IPTG agitando a 28°C durante 24 h. Las células se peletizaron y se lavaron con un volumen igual de tampón (5 mM de morfolina, pH 7,5). Después de centrifugar, las células se resuspendieron en mezcla de lisis para el cribado primario (ensayo de expandasa (1)).

3.2. Cribado primario en placas de microtitulación (MTP)

Crecimiento e inducción

La librería de expandasa de *E. coli* se sembró en placas con medio de Luria-Bertani (LB) con agar con bajo contenido en sal + 25 µg/ml de zeocina, y se incubó toda la noche a 37°C. Placas de microtitulación (MTP) con 150 µl de medio con bajo contenido de sal de LB y 25 µg/ml de zeocina se inocularon a partir de las placas y se incubaron 36 h a 25°C y 550 rpm.

A partir de la MTP, se inocularon 5 µl en una placa de pocillo profundo con 1 ml de medio 2*TY (triptona y extracto de levadura) + 50 µg/ml de zeocina + arabinosa. Al cultivo restante en las MTP se añadieron 100 µl de glicerol al 50% y se congeló a -80°C como lote de glicerol.

La placa de pocillos profundos se incubó durante 30 h a 25°C y 550 rpm. Los cultivos de la placa de pocillos profundos se centrifugó a 2750 rpm (Heraeus multifuge 4 kr.) durante 10 min. El sobrenadante se desechó, y el pelete se congeló a -20°C.

Extracto libre de células (CFE)

Los peletes congelados obtenidos en la sección previa se descongelaron en 200 µl de tampón de extracción (50 mM de Tris/HCl pH = 7,5; 5 mM de DTT; 0,1 mg/ml de ADNasa; 5 mM de MgSO₄·H₂O y 0,5 mg/ml de lisozima). Para resuspender los peletes, las placas se agitaron. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 10 minutos a 2750 rpm.

3.3 Cribado secundario en matraces de agitación

Crecimiento e inducción

Se inocularon colonias seleccionadas a partir de placa en 10 ml de LB con bajo contenido en sal + zeocina 25 µg/ml, y se incubó toda la noche a 37°C, 280 rpm. El cultivo que se hizo crecer se inoculó en 100 ml de LB con bajo contenido en sal con 25 µg/ml de zeocina a una densidad óptica (600 nm) entre 0,010 y 0,050 (Biochrom Ultraspec 2000). Después del crecimiento a 37°C, 280 rpm, las células se cosecharon a una densidad óptica a 600 nm entre 0,4-0,6. Después, se añadió arabinosa (concentración final 0,2%) y se indujeron toda la noche a 27°C a 220 rpm.

4. Ensayos de expandasa

4.1 Ensayo de expandasa (1) – Ensayo de cribado (ensayo primario):

Tampón de ensayo de expandasa: 5 mM de tampón de morfolina, pH 7,5, y mezcla de cofactores (concentraciones finales 50 µM de ATP, 1 mM de DTT, 60 µM de FESO₄, 2,7 mM de ascorbato), 500 µM de ad-6-APA, 1/10 volumen de lisado celular de *E. coli* y 2,4 mM de α-KG. Cada cofactor se obtuvo en tampón pH 7,5, que fue crítico para la actividad.

Se encontró que la reacción de expandasa fue lineal durante un tiempo hasta 3 horas con respecto a la formación/detección de adipil-7ADCA. Se determinó que la temperatura óptima para la reacción de expandasa in vitro fue aproximadamente 11°C, probablemente debido a la inestabilidad de la enzima o producción a mayores temperaturas. No obstante, el cribado real se llevó a cabo a una temperatura entre la temperatura ambiente y 25°C, lo que refleja mejor la temperatura de la condición de reacción deseada.

El cribado de las librerías propagadas de la familia en busca de la formación mejorada de 7-ADCA se determinó mediante Análisis de Inyección de Flujo - MS (FIA-MS, modo negativo, transición de masa [M-H]⁻ 341>295). Análisis final: columna de LC: usando condiciones de disolvente entre ácido fórmico al 0,1% en MeOH al 40% hasta MeOH al 100%. Se usaron dos canales (dos transiciones de masas [M-H]⁻) para monitorizar cada producto de reacción. Las muestras se analizaron después de 30 minutos de reacción.

4.2 Ensayo de expandasa (2) – Ensayo de expandasa secundario

Tampón de ensayo de expandasa: 5 mM de tampón de morfolina, pH 7,5, y mezcla de cofactores (concentraciones finales: 50 μM de ATP, 1 mM de DTT, 60 μM de FESO₄, 2,7 mM de ascorbato), 2 mM de ad-6-APA, 1/10 volumen de lisado celular de *E. coli* y 2,4 mM de α-cetoglutarato. Cada cofactor se obtuvo en tampón pH 7,5, que fue crítico para la actividad. La conversión se llevó a cabo a 29°C, y las muestras se tomaron entre 0 y 30 minutos. La reacción se detuvo con una concentración final de acetonitrilo al 60% (v/v). El adipil-7-ADCA formado se analizó en HPLC (fase móvil: 10% de acetonitrilo en 10 mM de tampón de fosfato, pH 3,0) columna: X-Terra™ RP18 3,5 μ, 3,9 x 100 mm, detectado a 214 y 254 nm (254 nm para analizar antibióticos expandidos). Análisis de datos de HPLC: software: Waters Millennium^{32®} 3.20.

4.3 Ensayo de expandasa (3) – Ensayo de expandasa

Se añadió un total de 300 μl de una mezcla de reacción que consiste en 50 mM de Tris/HCl pH 7,5; 1 mM de DTT; 2,7 mM de ascorbato; 0,05 mM de ATP; 24 mM de α-cetoglutarato; 0,06 mM de FESO₄·7H₂O; 4 mM de ácido adipil-6-aminopenicilánico (ad-6-APA) a 75 μl de CFE, y se incubó a 29°C durante el tiempo deseado. La adición de 60 μl de ácido maleico con 10 g/l de EDTA detuvo la reacción. La formación de ácido adipil-7-aminodesacetoxicefalosporínico (ad-7-ADCA) se detectó usando RMN ¹H.

El adipil-6-APA se obtuvo a partir de 6-APA y ácido adípico catalizado por penicilina acilasa (EC 3.5.1.11). Como alternativa, adipil-6-APA se puede obtener cultivando por ejemplo una cepa adecuada de *Penicillium chrysogenum* en presencia de ácido adípico como precursor.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonación de expandasa de tipo salvaje

El gen *cefE* se clonó mediante PCR a partir de ADN genómico de *S. clavuligerus* y se ligó en los vectores de fusión de GFP, la denominada serie pCK, y se usó para transformar *E. coli* TG1 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. NJ USA). Varias colonias de las transformaciones sembradas en placas se seleccionaron y se comprobaron en busca de un clon activo. Se identificaron varios clones activos. El clon “778” pareció ser un gen de tipo salvaje, pero de forma interesante, otro clon, el clon “779”, reveló una actividad fuertemente mejorada sobre la expansión de adipil-6-APA. El producto del clon “779” se secuenció y reveló tres mutaciones de aminoácidos (H18R, D284N y G300V). La producción de adipil-7-ADCA de los clones analizados mediante Análisis de Inyección de Flujo-Espectrometría de Masas (FIA/MS) mostró que el mutante de SC-*cefE* “779” fue superior a los progenitores de tipo salvaje. La medida de la fluorescencia de GFP sugiere que la mejora del producto de la enzima expandasa del clon “779” no es debida a la expresión mejorada de *cefE* allí. Por tanto, se concluyó que la mejora del producto enzimático de expandasa del clon “779” es una mejora de la actividad como resultado de las sustituciones de aminoácidos.

Vectores de fusión de GFP derivados de pCK

Se construyeron series de vectores de fusión con marcadores (las denominadas series pCK) que contienen un marcador His fusionado al extremo 3' de expandasa con fusión de proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo 3' del marcador HIS. Los vectores que contienen GFP permitieron la normalización de producción elevada de los datos de la actividad de expandasa en ensayos subsiguientes con respecto a la concentración de proteína. Los vectores contienen el origen de replicación p15A (número bajo de copias), y un promotor *lac* que está reprimido en presencia de glucosa.

Ejemplo 2

Propagación de la familia y cribado de los genes *cefE* de *N. lactamdurans* y *S. clavuligerus* de tipo salvaje – Librería A

Los genes de expandasa se propagaron mediante recombinación según el procedimiento descrito en el documento EP 752008. Se obtuvieron librerías mutantes de expandasas usando los vectores con marcadores con fusión con GFP (pCK). Sólo se propagó el ORF de *CefE*, mientras que otras secuencias no cambiaron. Después de mover el conjunto propagado de expandasas a los vectores pCK, se obtuvo un conjunto de librerías (Librería A) usando los dos genes de expandasas de tipo salvaje progenitores (*S. clavuligerus* y *N. lactamdurans*) más el clon “779”.

La siembra en placas inicial de una muestra de la librería mostró que las librerías contenían al menos 70% de colonias fluorescentes verdes. Debido a esto, no se consideró necesario cribar previamente colonias no fluorescentes antes de proceder a los primeros cribados de FIA/MS. La secuenciación de ADN de colonias distribuidas al azar del conjunto de la librería A indicó que todos los progenitores estuvieron representados en la librería, de manera que esta librería se seleccionó para el cribado inicial.

Se cribaron 720 clones de la librería A y se volvieron a ensayar 14 clones (expandasas mutantes H101, H102, H104, H106, H108, H111, H112, H114, H115, H117, H120, H122, H125, H127), y los resultados preliminares mostraron una mejora de la actividad de expandasa en comparación con la expandasa de *S. clavuligerus* (clon "778") como se puede juzgar mediante el ensayo de expandasa *in vitro* (1). Estos clones se escogieron para el ensayo posterior. La normalización de la actividad de expandasa con respecto a la concentración de expandasa-GFP (es decir, corrigiendo diferencias en la concentración de proteína de expandasa) confirmó que estos clones mejoraron en la actividad específica.

Ejemplo 3

Propagación de la familia de los genes *cefE* de *N. lactamdurans* y *S. clavuligerus* de tipo salvaje. Librería B

Se construyó la librería B propagando *cefE* de *N. lactamdurans* y *S. clavuligerus* de tipo salvaje como genes progenitores. La secuencia objetivo "779" no se usó en la construcción de esta librería. La librería de expandasa mostró que tiene un nivel significativo de clones inactivos o muy poco activos en la librería. A fin de eliminar los clones inactivos del ensayo posterior, se usó un cribado previo a base de FACS para el cribado de la librería B para mejorar el porcentaje de clones activos que entran en los ensayos de expandasas.

Después de la clasificación mediante FACS basada en su fluorescencia mediante GFP, las células seleccionadas se recuperaron en condiciones represivas. El ADN preparado a partir de estos cultivos se usó para transformar *E. coli* TG1. Estos constructos de expandasas usados son también proteínas de fusión con GFP como se describe para la librería A.

70-80 por ciento de la librería fue activa para GFP. En total, se cribaron entonces 2200 clones de esta librería usando el ensayo de expandasa *in vitro* y la detección mediante FIA-MS de la formación de adipil-7-ADCA.

Se seleccionaron catorce resultados posibles (serie H200). Cuatro de estos resultados, entre ellos H262, se confirmaron mediante un procedimiento de ensayo repetido que incluye la retransformación y el ensayo *in vitro* y análisis de MS.

Ejemplo 4

Construcción de secuencias de expandasas quiméricas usando expandasas propagadas. Librería C

Usando técnicas de biología molecular tradicionales y herramientas bioinformáticas, se recombinaron las secuencias objetivo procedentes de las dos librerías descritas anteriormente (librerías A y B), resultando la librería C (serie H300). Se ensayaron tres quimeras resultantes en busca de la actividad, entre ellas la expandasa H301.

Seis clones restantes (entre ellos: H305, H307, H308, H309) no se ensayaron como producto de fusión de GFP ni se analizaron mediante FIA-MS. Estos clones se volvieron a clonar directamente en la serie de vectores pSJ fusionados con la proteína de unión a maltosa (MBP) en dirección de los genes mutantes *CefE*, y se analizaron, tras el ensayo *in vitro*, en HPLC.

Ejemplo 5

Reclonación de genes que codifican expandasas mejoradas usando la serie de vectores basados en pSJ, y actividad enzimática de las expandasas mejoradas

Como vector de clonación para las librerías de expandasas, se usó pSJ08. Este plásmido se construyó sustituyendo el gen de expandasa (como fragmento *NdeI-NsiI*) por un oligonucleótido pequeño que introduce un sitio de restricción *NotI*. *cefE* de *S. clavuligerus* se clonó como un fragmento *NdeI-NsiI* en pSJ08, dando como resultado pSJ05.

pSJ05 contenía un sitio *NdeI* adicional justo en dirección del sitio *NsiI*. Este sitio se eliminó para evitar la posible interferencia con la clonación posterior de los genes propagados en los sitios *NdeI-NsiI*, dando como resultado pSJ11. A continuación, la proteína de unión a maltosa (MBP) se fusionó al extremo 5' de *cefE*, dando como resultado pSJ10. También se construyó un plásmido que contiene los genes de fusión de MBP-*cefE* para *Nocardia lactamdurans* (pSJ01). El análisis de las secuencias de ADN confirmó todas las secuencias.

Los clones mejorados procedentes de la librería A, B y C se volvieron a clonar a partir de los vectores pCK en el vector pSJ10 (MBP-*cefE* detrás del promotor *tac*). Esto se llevó a cabo amplificando las expandasas mejoradas mediante PCR. El cebador directo (extremo 5') introduce un *NdeI*, y el cebador inverso (extremo 3') introduce un sitio

Nsi. Después de la digestión con *Nde*I y *Nsi*I, el resultado se clonó en el vector *E. coli* (pSJ10) y en el vector de *Penicillium chrysogenum* (pIATWAn - Figura 2/3) Tabla 2.

Finalmente, se secuenciaron unos pocos clones de cada, y se usó uno de cada, que contiene la secuencia correcta verificada, para el análisis posterior.

- 5 Las secuencias de ADN y de aminoácidos de los mejores resultados de expandasas se incluyeron en el listado de secuencias – véase la Tabla 2 para un resumen.

Inducción de la expresión

- 10 NM554 de *E. coli* se hizo crecer toda la noche en medio 2xTY con cloranfenicol (30 µg/ml) a 37°C. Las células se diluyeron hasta una densidad óptica a 540 nm (OD₅₄₀) de 0,010-0,020 en 2xTY reciente con cloranfenicol (30 µg/ml). Cuando las células alcanzaron una densidad óptica a 540 nm de 0,4-0,6, se añadió IPTG (concentración final 0,5 mM) y se indujo la expresión toda la noche a 27°C.

Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón de extracción (5 mM de DTT, 50 mM de Tris/HCl, pH 7,5, con lisozima), y se sometieron a ultrasonidos (en agua con hielo). Tras centrifugar, el sobrenadante se usó para el ensayo de expandasa (2).

- 15 La expresión de la expandasa en el extracto libre de células se determinó mediante SDS-PAGE.

Tabla 2. Resultados de expandasas de las series H100, H200 y H300, su mutación o mutaciones, sus vectores de expresión de *E. coli* y de *Penicillium*, y su actividad de expandasa (ensayo 2).

Expandasa	SEC ID nº	Secuencia de la cadena principal	mutaciones	Vector		Act. esp. *	I.F. (**)
				<i>Penicillium</i>	MBP-cefE		
<i>CefE</i> de <i>S. clavuligerus</i> "778"	1	Tipo salvaje	Ninguna		pAJL104	12	1
<i>CefE</i> de <i>N. lactamdurans</i>	2	Tipo salvaje	Ninguna		pJS01	4	0,3
"779"	3	778	H18R+D284N +G300V				
H101	6				pSJ101	63	5,3
H106		778	H18R, S112T		pSJ106	59	4,9
H111	7				pSJ111	77	6,4
H122	8				pSJ122	61	5,1
H127	5				pSJ127	72	6,0
H262	4		Propagada	pIAT262	pSJ262	40	3,3
H301	9		H18R, D284N, G300V, M73T	pIAT301	pSJ301	49	4,1
H305	10	H261	G300V	pIAT305	pSJ305	45	3,8
H307	11	H262	M74T	pIAT307	pSJ307		
H308	12	H262	D285N	pIAT308	pSJ308	48	4,0
H309	13	H262	M74T, D285N	pIAT309	pSJ309	46	3,8

* Actividad específica (nmoles de 7-ADCA.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína)

- 20 ** I.F. = Factor de mejora; igual a la relación de la actividad específica de las expandasa mutante y la actividad específica de la expandasa de *S. clavuligerus*

Ejemplo 6

Expresión de expandasa H122 y H127 en *Penicillium chrysogenum*

Las variantes H122 y H127 de las expandasas se clonaron en vectores para la expresión en *Penicillium chrysogenum* (plásmidos de las series pIAT, Tabla 2). Los genes de expandasas propagados se clonaron en un vector plasmídico con un replicón de *E. coli* y un marcador seleccionable. Para expresar el gen de expandasa, se usó un promotor compatible con la expresión en *P. chrysogenum*, es decir, el promotor IPNS. Adicionalmente está presente un marcador seleccionable para *Penicillium chrysogenum* (amdS).

Los constructos de expresión se obtuvieron digiriendo el constructo de expresión, pIAT127 (expandasa H127) y pIAT122 (expandasa H122), con *NotI*. Una *Penicillium chrysogenum* altamente productiva se cotransformó con los fragmentos lineales junto con el casete de expresión amdS (digestión con *HindIII*).

Prediciendo con adipato, la producción de adipil-7-ADCA se puede ensayar en cepas que expresan genes de expandasa activos.

La producción de cefalosporina de la cepa de expandasa de expresión H127 se comparó con la cepa que expresa expandasa de tipo salvaje en un régimen discontinuo con lactosa como fuente de carbono. La producción de adipil-7-ADCA aumentó entre 10-50%, y la producción total de β -lactama aumentó en 0-30%, dependiendo de la concentración de lactosa y de adipato.

Adicionalmente, la expandasa H122 se expresó en *Penicillium chrysogenum*. La comparación de la producción de cefalosporina con la cepa que expresa expandasa de tipo salvaje mostró que la producción de adipil-7-ADCA aumentó entre 0 y 50%, y la producción total de beta-lactama varió entre -20 a 0%, dependiendo de la concentración de lactosa y de adipato en el medio.

Ejemplo 7

Expandasas mejoradas de 1ª generación (serie H400)

La librería de expandasas de primera generación se construyó llevando a cabo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) propensa a error (EP) en el gen CefE de *Streptomyces clavuligerus* de tipo salvaje (SEC ID No. 1). Después de cribar esta librería en busca de la conversión mejorada de ad-6-APA en ad-7-ADCA, se seleccionaron 3 genes mutantes diferentes. Los mutantes mostraron una actividad de expansión de ad-6-APA mejorada de hasta 2,5 veces (H401, H402, H403: véase la Tabla 3).

Ejemplo 8

Expandasas mejoradas de 2ª generación (serie H500)

La librería de expandasas de segunda generación se construyó usando PCR con cebadores de mutación saturados (sMPP) exactamente según el documento WO 03/010183. Los genes mutantes seleccionados procedentes de la primera generación (H401, H402 y H403) se usaron como moldes para la construcción de la librería de 2ª generación.

La sMPP se llevó a cabo usando Taq polimerasa, introduciendo de ese modo mutaciones adicionales (al azar) e incrementando la variación de la librería. Los cebadores diseñados se hibridaron en las posiciones de las mutaciones y se saturaron en las mutaciones encontradas en los resultados de expandasas de 1ª generación. Adicionalmente, se diseñó un cebador directo e inverso universal en el que se introdujeron respectivamente un sitio *NdeI* y *NsiI*. Esto facilitó la clonación en el vector de expresión de *Penicillium* para el ensayo *in vivo* de las expandasas mutantes.

La librería se hizo crecer, y se indujo la expresión de la expandasa como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La formación de ad-7-ADCA se determinó usando RMN como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Se seleccionaron aproximadamente 150 expandasas mutantes mejoradas, y se volvieron a ensayar para determinar su actividad de expandasa en ad-6-APA. Basándose en los resultados de este nuevo ensayo, se seleccionaron 17 mutantes para los ensayos finales en matraces de agitación y los análisis mediante HPLC como se describe en los Materiales y Métodos.

En total, 15 de los 17 resultados seleccionados mostraron una actividad de expandasa significativamente mejorada con ad-6-APA como sustrato. Para excluir la selección de falsos positivos de mutantes de expresión, los niveles proteicos se cuantificaron en SDS-PAGE. Esto confirmó que la actividad mejorada no fue debida a una expresión más potente de expandasa en *E. coli*, sino que la mejora se pudo atribuir a una actividad específica mejorada del mutante de expandasa.

En total, se identificaron 8 expandasas mutantes que mostraron un factor de mejora de su expandasa en ad-6-APA de hasta 4,5 veces (en comparación con la expandasa de tipo salvaje de *S. clavuligerus* - SEC ID No 1). Estos mutantes se denominaron H501-H508 (véase la Tabla 3).

Ejemplo 9

3ª Generación de expandasas mejoradas (serie H600)

5 Los 8 mutantes obtenidos en el Ejemplo 2 de la 2ª generación (H501-H508) se usaron como moldes para la construcción de la librería de expandasas de 3ª generación. Esta librería se construyó de la misma manera como la librería de expandasas de 2ª generación. Adicionalmente, la secuencia de señalización SKA en el término C de las expandasas se cambió a SKD, provocando la expresión de expandasa únicamente en el citosol cuando se expresa en *Penicillium*.

El cribado de esta librería produjo 22 genes mutantes de expandasas diferentes que se mejoraron significativamente entre 5 veces y 11 veces en comparación con expandasa de *S. clavuligerus* (Tabla 3, serie H600).

10 El cribado de la misma librería una segunda vez produjo 13 expandasas mutantes adicionales (G601-G611 y G613-G614; véase la Tabla 3).

Ejemplo 10

Actividad de expandasas mutantes mejoradas con isopenicilina N (iPN) y Penicilina-G (Pen-G) como sustrato

15 La actividad de varias expandasas mutantes se midió usando iPN y Pen-G como sustrato. El ensayo con iPN como sustrato se llevó a cabo como se describió en la sección de Materiales y Métodos, excepto que se sustituyó ad-6-APA por la misma concentración de iPN (4 mM). El ensayo con Pen-G como sustrato se llevó a cabo como se describe en la sección de Materiales y Métodos, excepto que se sustituyó ad-6-APA por 7 mM de Pen-G. La Tabla 3 resume las actividades de los diversos mutantes de expandasas para iPN y Pen-G.

20 Mientras que la mayoría de los mutantes de expandasas ensayados mostró una mejora de 5 veces de su actividad de expandasa con iPN, los mutantes que poseen la mutación T89K perdieron virtualmente toda la actividad con respecto a iPN.

25 La actividad con respecto a Pen-G de los diversos mutantes de expandasas ensayados fue la misma que la expandasa de tipo salvaje (el factor de mejora es 1) o mejoraron hasta 8 veces. Los datos muestran además que no hay ninguna correlación en absoluto entre los factores de mejora obtenidos para un único mutante con ad-6-APA y Pen-G como sustrato. La relación entre los factores de mejora respectivos para ad-6-APA y Pen-G varían en un intervalo de 0,1 (por ejemplo H654) a 1,2 (por ejemplo H503).

30 Tabla 3. Expandasas mutantes y su actividad de expandasa frente a ad-6-APA, Pen-G e iPN. Cada mutante se identifica por su código; las mutaciones se introducen en la expandasa modelo de *S. clavuligerus* (SEC ID NO 1). La actividad de expandasa se expresa como factor de mejora en comparación con la expandasa modelo de *S. clavuligerus* (por definición, actividad de expandasa = 1) según los ensayos de expandasas in vitro descritos en la sección Materiales y Métodos y en el Ejemplo 4.

Mutante	Código	Mutaciones	Actividad de expandasa (factor de mejora)		
			ad-6-APA	Pen-G	iPN
1.	H401	L277Q	1,5		
2.	H402	D2N+C281Y	2,5		
3.	H403	T89A	1,5		
4.	H501	T89A+C281Y	3,9	3,0	2,6
5.	H502	D2Y+C281Y+R3067+A311D	4,5	4,0	5,3
6.	H503	D2N+T89V+C281Y	3,5	4,0	3,2
7.	H504	T89K+C281Y+T293K	3,9	1,0	0,0
8.	H505	T89K+C281Y	3,3	1,0	0,0
9.	H506	L277Q+G300S	2,9	3,0	4,6
10.	H507	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+L277T+C281Y	3,7	3,0	3,0
11.	H508	D2H+L277Q+E280G+C281Y	4,6	4,0	5,1

ES 2 395 945 T3

Mutante		Mutaciones	Actividad de expandasa (factor de mejora)		
			ad-6-APA	Pen-G	iPN
12.	H601	M73H+T89K+C281Y+A311D	7,5	1,2	0,0
13.	H602	T89K+Y217H+C281Y+A311D	7,6	1,1	0,0
14.	H603	T89K+H244R+C281Y+A311D	6,8	1,7	0,0
15.	H604	T89K+C281Y+R307T+A311D	6,9	1,4	0,0
16.	H605	T89K+C281Y+R307T+A311D	7,2	1,5	0,0
17.	H606	M73I+T89K+C281Y+T293K+G300S+R307T+A311D	8,8	1,9	0,0
18.	H607	T89K+C281Y+T293K+G300S+A311D	7,0	1,3	0,0
19.	H608	T89K+C281Y+A311D	5,8	1,0	0,0
20.	H609	M73H+T89K+T213A+C281Y+A311D	6,2	1,3	0,0
21.	H650	T105I+G113D+C155W+P177L+C281Y+R306?+A311D	8,2	7,1	11,0
22.	H651	C155W+P177L+L277Q+E280G+C281Y+R306?+A311D	10,6	8,9	11,0
23.	H652	L277Q+C281Y+R306?+A311D		5,0	10,0
24.	H653	T89V+C281Y+R306?+A311D	9,0	5,8	11,0
25.	H654	T89K+R249C+C281Y+R306?+A311D	6,3	0,8	0,0
26.	H655	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+C281Y+R306?+A311D	8,2	7,1	10,0
27.	H656	D2N+N90S+M99T+T105I+G113D+C281Y+R306 ?+A311D	5,0	3,7	5,0
28.	H657	N90S+T105I+G113D+C281Y+R306?+A311D	6,9	4,6	8,0
29.	H658	D2N+T89V+C281Y+R306?+A311D	8,4	6,3	10,0
30.	H659	T89K+C281Y+R306?+A311D	6,4	0,8	0,0
31.	H660	N90W+C281Y+R306?+A311D	5,3	4,4	5,0
32.	H661	D2Y+C155W+C281Y+R306?+A311D	9,7	6,4	
33.	H662	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+L277T+C281Y+R306?+A311D	5,6	5,2	6,0
34.	G601	T89V+A278V+C281L+307supresión+A311D	7,4	6,8	
35.	G602	D2N+T89V+C155W+P177L+L277T+C281Y+A311D	3,9	4,4	
36.	G603	S59G+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+G209S+C281Y+307supresión+A311D	6,3	6,4	
37.	G604	D2N+N90W+C281Y+307supresión+A311D	4,6	5,7	
38.	G605	D2Y+C155W+P177I+C281Y+307supresión+A311D+SGRS	5,1	4,6	
39.	G606	D2Y+N90S+Y101F+T105I+G113D+C155W+P177I+C281Y+307supresión+A311D	8,2	8,1	
40.	G607	N90S+T105I+G113D+C155W+P177I+C281Y+R307T+A311D	7,2	6,7	
41.	G608	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177I+L277T+C281Y+R307I+A311D	6,0	4,6	
42.	G609	D2Y+T89V+C281Y+307supresión+A311D	6,6	4,5	
43.	G610	D2N+T89V+T105I+G13D+C155W+P177L+C281Y+A311D	6,4	7,7	
44.	G611	T89V+T105I+G13D+C155W+P177L+C281Q+307supresión+A311D	7,0	7,9	
45.	G613	T89V+H170Y+D251G+L277Q+C281Y+307supresión+A311D	4,3	4,4	

ES 2 395 945 T3

Mutante		Mutaciones	Actividad de expandasa (factor de mejora)		
			ad-6-APA	Pen-G	iPN
46.	G614	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+L277T+C281Y+T293K+307supresión+A311D	7,2	8,9	

La Tabla 3 muestra que se han obtenido expandasas mutantes que tienen factores de mejora en el intervalo de 1,5 a 10,6 veces.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> DSM IP Assets B.V.
- <120> Expandasas mutantes
- <130> 24172WO
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.1
- 10 <210> 1
- <211> 936
- <212> ADN
- <213> *Streptomyces clavuligerus*
- <220>
- 15 <221> exón
- <222> (1)..(933)
- <223>
- <400> 1

```

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc      48
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly
1                               5                               10                               15

ctg cac cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc      96
Leu His Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe
                               20                               25                               30

tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag      144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys
                               35                               40                               45

gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc      192
Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg
                               50                               55                               60

gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg      240
Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu
65                               70                               75                               80

gag tcg gag agc acc gcc cag atc acc aat acc ggc agc tac tcc gac      288
Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp
                               85                               90                               95

tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc      336
Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser
                               100                              105                              110

ggg gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac acc      384
Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr
                               115                              120                              125

gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag      432

```

ES 2 395 945 T3

Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu	
130	135 140
ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg	480
Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg	
145	150 155 160
ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc gag cac cgc agc gcc gag gag cag	528
Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln	
	165 170 175
ccc ctg cgg atg gcg ccg cac tac gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc	576
Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile	
	180 185 190
cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc	624
Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val	
	195 200 205
ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc	672
Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val	
	210 215 220
ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc	720
Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala	
	225 230 235 240
ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc agc	768
Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser	
	245 250 255
agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc	816
Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr	
	260 265 270
ttc tcc gtc ccg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc gat gtc agc ctg gac	864
Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asp Val Ser Leu Asp	
	275 280 285
ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggc ggc aac tac gtg aac	912
Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Gly Asn Tyr Val Asn	
	290 295 300
atc cgc cgc aca tcc aag gca tga	936
Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala	
305	310

<210> 2

<211> 970

<212> ADN

5 <213> *Nocardia lactamdurans*

<220>

<221> exón

<222> (1)..(942)

<223>

10 <400> 2

ES 2 395 945 T3

atg acg gac gcg acc gtg ccg acc ttc gat ctg gcc gag ctg cgt gag Met Thr Asp Ala Thr Val Pro Thr Phe Asp Leu Ala Glu Leu Arg Glu 1 5 10 15	48
ggc ttg cac cag gag gag ttc cgc cac tgc ctg cgc gag aag ggc gtg Gly Leu His Gln Glu Glu Phe Arg His Cys Leu Arg Glu Lys Gly Val 20 25 30	96
ttc tac ctc aag ggc acc ggg ctc gcc gag gcg gac cac gcc tcg gcg Phe Tyr Leu Lys Gly Thr Gly Leu Ala Glu Ala Asp His Ala Ser Ala 35 40 45	144
cgg gag atc gcg gtg gac ttc ttc gac cac ggc acc gag gcc gag aag Arg Glu Ile Ala Val Asp Phe Phe Asp His Gly Thr Glu Ala Glu Lys 50 55 60	192
aag gcg gtg atg acg ccg atc ccg acc atc cgg cgc ggg tac gcc ggg Lys Ala Val Met Thr Pro Ile Pro Thr Ile Arg Arg Gly Tyr Ala Gly 65 70 75 80	240
ctg gag tcc gag agc acc gcg cag atc acg aac acc ggc aag tac acc Leu Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr 85 90 95	288
gac tac tcg atg tcg tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctg ttc ccc Asp Tyr Ser Met Ser Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro 100 105 110	336
agc gcc gag ttc gag aag gcg tgg gag gac tac ttc gcg cgg atg tac Ser Ala Glu Phe Glu Lys Ala Trp Glu Asp Tyr Phe Ala Arg Met Tyr 115 120 125	384
cgc gct tcg cag gac gtc gcg ccg cag gtg ctg acc tcg gtc ggc gcg Arg Ala Ser Gln Asp Val Ala Arg Gln Val Leu Thr Ser Val Gly Ala 130 135 140	432
gaa ccc gag gtc ggc atg gac gcc ttc ctc gac tgc gaa ccc ctg ctg Glu Pro Glu Val Gly Met Asp Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu 145 150 155 160	480
cgc ctg cgc tac ttc ccc gag gtg ccc gag gat cgc gtg gcc gag gag Arg Leu Arg Tyr Phe Pro Glu Val Pro Glu Asp Arg Val Ala Glu Glu 165 170 175	528
cag ccg ctg ccg atg gcc ccg cat tac gac ctc tcg atc gtc acc ctg Gln Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Ile Val Thr Leu 180 185 190	576
atc cac cag acc cct tgc gcg aac ggg ttc gtc agc ctg cag gtc gag Ile His Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Val Glu 195 200 205	624
gtg gac ggg tcc tat gtg gac atc ccg gcg cag ccg ggc gcg gtg ctg Val Asp Gly Ser Tyr Val Asp Ile Pro Ala Gln Pro Gly Ala Val Leu	672

ES 2 395 945 T3

210	215	220	
gtg ttc tgc ggc gcg gtg gcg acg ctg gtg gcc gac ggc gcg atc aag			720
Val Phe Cys Gly Ala Val Ala Thr Leu Val Ala Asp Gly Ala Ile Lys			
225	230	235	240
gcg ccc aag cac cac gtg gcc gcg ccc ggc gcg gac aag cgg gtg ggc			768
Ala Pro Lys His His Val Ala Ala Pro Gly Ala Asp Lys Arg Val Gly			
	245	250	255
agc agc cgc acc tcc agc gtg ttc ttc ctg cgc ccc aac ggg gac ttc			816
Ser Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Gly Asp Phe			
	260	265	270
cgc ttc tcg gtg ccg cgg gcc agg gag tgc ggg ttc gac gtc agc atc			864
Arg Phe Ser Val Pro Arg Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asp Val Ser Ile			
	275	280	285
ccg gcc gag acc gcc acc ttc gac gac tgg atc ggc ggc aac tac atc			912
Pro Ala Glu Thr Ala Thr Phe Asp Asp Trp Ile Gly Gly Asn Tyr Ile			
	290	295	300
aac atc cgg aag acc gcc gcc gcc cgg ctt tgaaggctct tcatgacgag			962
Asn Ile Arg Lys Thr Ala Ala Ala Arg Leu			
305	310		
ccaatgca			970

<210> 3

<211> 936

<212> ADN

5 <213> Artificial

<22 0>

<223> 779

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(936)

<223>

<400> 3

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc	48		
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly			
1	5	10	15
ctg cgc cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc	96		
Leu Arg Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe			
	20	25	30
tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag	144		
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys			
	35	40	45
gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc	192		

ES 2 395 945 T3

Asp	Ile	Val	Ile	Asp	Phe	Phe	Glu	His	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Arg	
50						55					60					
gcc	gtc	acc	tcg	ccc	gtc	ccc	acc	atg	cgc	cgc	ggc	ttc	acc	ggg	ctg	240
Ala	Val	Thr	Ser	Pro	Val	Pro	Thr	Met	Arg	Arg	Gly	Phe	Thr	Gly	Leu	
65					70				75						80	
gag	tcg	gag	agc	acc	gcc	cag	att	acc	aat	acc	ggc	agc	tac	tcc	gac	288
Glu	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Gln	Ile	Thr	Asn	Thr	Gly	Ser	Tyr	Ser	Asp	
				85					90						95	
tac	tcg	atg	tgc	tac	tcg	atg	ggc	acc	gcg	gac	aac	ctc	ttc	ccg	tcc	336
Tyr	Ser	Met	Cys	Tyr	Ser	Met	Gly	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Phe	Pro	Ser	
			100					105					110			
ggt	gac	ttc	gag	cgg	atc	tgg	acc	cag	tac	ttc	gac	cgc	cag	tac	acc	384
Gly	Asp	Phe	Glu	Arg	Ile	Trp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Asp	Arg	Gln	Tyr	Thr	
		115					120					125				
gcc	tcc	cgc	gcg	gtc	gcc	cgg	gag	gtc	ctg	cgg	gcg	acc	ggg	acc	gag	432
Ala	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	Arg	Glu	Val	Leu	Arg	Ala	Thr	Gly	Thr	Glu	
	130					135					140					
ccc	gac	ggc	ggg	gtc	gag	gcc	ttc	ctc	gac	tgc	gag	ccg	ctg	ctg	cgg	480
Pro	Asp	Gly	Gly	Val	Glu	Ala	Phe	Leu	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Leu	Arg	
145					150					155					160	
ttc	cgc	tac	ttc	ccg	cag	gtc	ccc	gag	cac	cgc	agc	gcc	gag	gag	cag	528
Phe	Arg	Tyr	Phe	Pro	Gln	Val	Pro	Glu	His	Arg	Ser	Ala	Glu	Glu	Gln	
				165					170						175	
ccc	ctg	cgg	atg	gcg	ccg	cac	tac	gac	ctg	tcg	atg	gtc	acc	ctc	atc	576
Pro	Leu	Arg	Met	Ala	Pro	His	Tyr	Asp	Leu	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Ile	
			180					185					190			
cag	cag	aca	ccc	tgc	gcc	aac	ggc	ttc	gtc	agc	ctc	cag	gcc	gag	gtc	624
Gln	Gln	Thr	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Phe	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Val	
		195					200					205				
ggc	ggc	gcg	ttc	acg	gac	ctg	ccc	tac	cgt	ccg	gac	gcc	gtc	ctc	gtc	672
Gly	Gly	Ala	Phe	Thr	Asp	Leu	Pro	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Val	
	210					215					220					
ttc	tgc	ggc	gcc	atc	gcg	acc	ctg	gtg	acc	ggc	ggc	cag	gtc	aag	gcc	720
Phe	Cys	Gly	Ala	Ile	Ala	Thr	Leu	Val	Thr	Gly	Gly	Gln	Val	Lys	Ala	
225					230					235					240	
ccc	cgg	cac	cat	gtc	gcg	gcc	ccc	cgc	agg	gac	cag	ata	gcg	ggc	agc	768
Pro	Arg	His	His	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Asp	Gln	Ile	Ala	Gly	Ser	
				245					250					255		
agc	cgc	acc	tcc	agt	gtg	ttc	ttc	ctc	cgt	ccc	aac	gcg	gac	ttc	acc	816
Ser	Arg	Thr	Ser	Ser	Val	Phe	Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Ala	Asp	Phe	Thr	
			260					265					270			
ttc	tcc	gtc	ccg	ctg	gcg	cgc	gag	tgc	ggc	ttc	aat	gtc	agc	ctg	gac	864
Phe	Ser	Val	Pro	Leu	Ala	Arg	Glu	Cys	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Leu	Asp	

ES 2 395 945 T3

275	280	285	
ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg gtc aac tac gtg aac			912
Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Val Asn			
290	295	300	
atc cgc cgc aca tcc aag gca tga			936
Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala			
305	310		

<210> 4

<211> 939

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H262

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(936)

<223>

<400> 4

atg acg gac gcg acc gtg ccg acc ttc gat ctg gcc gag ctg cgt gag	48		
Met Thr Asp Ala Thr Val Pro Thr Phe Asp Leu Ala Glu Leu Arg Glu			
1	5	10	15
ggc ttg cac cag gag gag ttc cgc cac tgc ctg cgc gag aag gcc gtg	96		
Gly Leu His Gln Glu Glu Phe Arg His Cys Leu Arg Glu Lys Gly Val			
20	25	30	
ttc tac ctc aag ggc acc ggg ctc gcc gag gcg gac cac gcc tcg gcg	144		
Phe Tyr Leu Lys Gly Thr Gly Leu Ala Glu Ala Asp His Ala Ser Ala			
35	40	45	
cgg gag atc gcg gtg gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag	192		
Arg Glu Ile Ala Val Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys			
50	55	60	
cgc gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg	240		
Arg Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly			
65	70	75	80
ctg gag tcg gag agc acc gcg cag atc acg aac acc ggc agc tac tcc	288		
Leu Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser			
85	90	95	
gac tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg	336		
Asp Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro			
100	105	110	
tcc ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac	384		
Ser Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr			
115	120	125	

ES 2 395 945 T3

acc gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc	432
Thr Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr	
130 135 140	
gag ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg	480
Glu Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu	
145 150 155 160	
cgg ttc cgc tac ttc ccg cag gtg ccc gag gat cgc gtg gcc gag gag	528
Arg Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu Asp Arg Val Ala Glu Glu	
165 170 175	
cag ccg ctg cgg atg gcc ccg cac tac gac ctc tcg atc gtc acc ctg	576
Gln Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Ile Val Thr Leu	
180 185 190	
atc cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag	624
Ile Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu	
195 200 205	
gtc ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc	672
Val Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu	
210 215 220	
gtc ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag	720
Val Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys	
225 230 235 240	
gcc ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc	768
Ala Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly	
245 250 255	
agc agc cgc acc tcc agc gtg ttc ttc ctg cgc ccc aac ggg gac ttc	816
Ser Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Gly Asp Phe	
260 265 270	
cgc ttc tcg gtg ccg cgg gcc agg gag tgc ggg ttc gac gtc gcc ctg	864
Arg Phe Ser Val Pro Arg Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asp Val Gly Leu	
275 280 285	
gac ggc gag acc gcc acg ttc cgg gat tgg atc ggg ggc aac tac gtg	912
Asp Gly Glu Thr Ala Thr Phe Arg Asp Trp Ile Gly Gly Asn Tyr Val	
290 295 300	
aac atc cgc cgc aca tcc aag gca tag	939
Asn Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala	
305 310	

<210> 5

<211> 936

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H127

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(933)

<223>

ES 2 395 945 T3

<400> 5

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc	48
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
ctg cgc cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc	96
Leu Arg Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe	
20 25 30	
tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag	144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys	
35 40 45	
gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc	192
Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg	
50 55 60	
gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg	240
Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
gag tcg gag agc acc gcc cag att acc aat acc ggc agc tac tcc gac	288
Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp	
85 90 95	
tac tcg atg tcg tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctg ttc ccc aqc	336
Tyr Ser Met Ser Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser	
100 105 110	
gcc gag ttc gag aag gcg tgg gag gac tac ttc gcg cgg atg tac cgc	384
Ala Glu Phe Glu Lys Ala Trp Glu Asp Tyr Phe Ala Arg Met Tyr Arg	
115 120 125	
gct tcg cag gac gtc gcg cgg cag gtg ctg acc tcg gtc ggc gcg gaa	432
Ala Ser Gln Asp Val Ala Arg Gln Val Leu Thr Ser Val Gly Ala Glu	
130 135 140	
ccc gag gtc ggc atg gac gcc ttc ctc gac tgc gaa ccc ctg ctg cgc	480
Pro Glu Val Gly Met Asp Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg	
145 150 155 160	
ctg cgc tac ttc ccc gag gtg ccc gag gat cgc gtg gcc gag gag cag	528
Leu Arg Tyr Phe Pro Glu Val Pro Glu Asp Arg Val Ala Glu Glu Gln	
165 170 175	
ccg ctg cgg atg gcc ccg cac tac gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc	576
Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile	
180 185 190	
cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc	624

ES 2 395 945 T3

Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val	
195 200 205	
ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc	672
Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val	
210 215 220	
ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc	720
Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala	
225 230 235 240	
ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg gcc agc	768
Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser	
245 250 255	
agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc	816
Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr	
260 265 270	
ttc tcc gtc ccg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc aat gtc agc ctg gac	864
Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asn Val Ser Leu Asp	
275 280 285	
ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg gtc aac tac gtg aac	912
Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Val Asn	
290 295 300	
atc cgc cgc aca tcc aag gca tga	936
Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala	
305 310	

<210> 6

<211> 962

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H101

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(933)

<223>

<400> 6

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc	48
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
ctg cgc cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc	96
Leu Arg Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe	
20 25 30	
tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag	144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys	

ES 2 395 945 T3

	35		40		45															
	gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc																			192
	Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg																			
	50		55		60															
	gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg																			240
	Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu																			
	65		70		75															80
	gag tcg gag agc acc gcc cag att acc aat acc ggc agc tac tcc gac																			288
	Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp																			
			85		90															95
	tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc																			336
	Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser																			
			100		105															110
	ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac acc																			384
	Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr																			
			115		120															125
	gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag																			432
	Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu																			
			130		135															140
	ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg																			480
	Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg																			
			145		150															160
	ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc gag cac cgc agc gcc gag gag cag																			528
	Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln																			
			165		170															175
	ccc ctg cgg atg gcg ccg cac tac gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc																			576
	Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile																			
			180		185															190
	cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc																			624
	Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val																			
			195		200															205
	ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc																			672
	Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val																			
			210		215															220
	ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc																			720
	Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala																			
			225		230															240
	ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg gcc agc																			768
	Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser																			
			245		250															255
	agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc																			816
	Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr																			
			260		265															270

ES 2 395 945 T3

ttc tcc gtc ccg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc aat gtc agc ctg gac	864
Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asn Val Ser Leu Asp	
275 280 285	
ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg gtc aac tac gtg aac	912
Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Val Asn	
290 295 300	
atc cgc cgc aca tcc aag gca tgataggctc ttcattgacga gaatatgca	962
Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala	
305 310	

<210> 7

<211> 936

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H111

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(933)

<223>

<400> 7

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc	48
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
ctg cgc cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc	96
Leu Arg Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe	
20 25 30	
tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag	144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys	
35 40 45	
gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc	192
Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg	
50 55 60	
gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg	240
Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
gag tcg gag agc acc gcc cag att acc aat acc ggc agc tac tcc gac	288
Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp	
85 90 95	
tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc	336
Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser	
100 105 110	

ES 2 395 945 T3

ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac acc 384
 Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr
 115 120 125

gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag 432
 Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu
 130 135 140

ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg 480
 Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg
 145 150 155 160

ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc gag cac cgc agc gcc gag gag cag 528
 Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln
 165 170 175

ccc ctg cgg atg gcg ccg cac tac gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc 576
 Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile
 180 185 190

cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc 624
 Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val
 195 200 205

ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc 672
 Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val
 210 215 220

ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc 720
 Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala
 225 230 235 240

ccc cgg cac caa gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc agc 768
 Pro Arg His Gln Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser
 245 250 255

agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc 816
 Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr
 260 265 270

ttc tcc gtc ccg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc aat gtc agc ctg gac 864
 Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asn Val Ser Leu Asp
 275 280 285

ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg gtc aac tac gtg aac 912
 Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Val Asn
 290 295 300

atc cgc cgc aca tcc aag gca tga 936
 Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala
 305 310

<210> 8

<211> 936

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H122

<220>

<221> exón

ES 2 395 945 T3

<222> (1)..(933)

<223>

<400> 8

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc	48
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
ctg cac cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc	96
Leu His Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe	
20 25 30	
tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag	144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys	
35 40 45	
gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc	192
Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg	
50 55 60	
gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg	240
Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
gag tcg gag agc acc gcc cag atc acc aat acc ggc agc tac tcc gac	288
Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp	
85 90 95	
tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc	336
Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser	
100 105 110	
ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac acc	384
Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr	
115 120 125	
gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag	432
Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu	
130 135 140	
ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg	480
Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg	
145 150 155 160	
ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc gag cac cgc agc gcc gag gag cag	528
Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln	
165 170 175	
ccc ctg cgg atg gcg ccg cac tac gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc	576
Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile	

ES 2 395 945 T3

	180		185		190	
	cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc					624
	Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val					
	195		200		205	
	ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc					672
	Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val					
	210		215		220	
	ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc					720
	Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala					
	225		230		235	240
	ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc agc					768
	Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser					
		245		250		255
	agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc					816
	Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr					
		260		265		270
	ttc tcc gtc ccg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc aat gtc agc ctg gac					864
	Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asn Val Ser Leu Asp					
		275		280		285
	ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg gtc aac tac gtg aac					912
	Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Val Asn					
		290		295		300
	atc cgc cgc aca tcc aag gca tga					936
	Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala					
	305		310			

<210> 9

<211> 936

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H301

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(933)

<223>

<400> 9

	atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc					48
	Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly					
	1		5		10	15
	ctg cgc cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc					96
	Leu Arg Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe					
		20		25		30

ES 2 395 945 T3

tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag	144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys	
35 40 45	
gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc	192
Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg	
50 55 60	
gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc acg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg	240
Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Thr Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
gag tcg gag agc acc gcc cag att acc aat acc ggc agc tac tcc gac	288
Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp	
85 90 95	
tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc	336
Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser	
100 105 110	
ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac acc	384
Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr	
115 120 125	
gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag	432
Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu	
130 135 140	
ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg	480
Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg	
145 150 155 160	
ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc gag cac cgc agc gcc gag gag cag	528
Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln	
165 170 175	
ccc ctg cgg atg gcg ccg cac tac gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc	576
Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile	
180 185 190	
cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc	624
Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val	
195 200 205	
ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc	672
Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val	
210 215 220	
ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc	720
Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala	
225 230 235 240	
ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc agc	768
Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser	
245 250 255	

ES 2 395 945 T3

```

agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc      816
Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr
                260                265                270

ttc tcc gtc ccg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc aat gtc agc ctg gac      864
Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asn Val Ser Leu Asp
                275                280                285

ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg gtc aac tac gtg aac      912
Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Val Asn
                290                295                300

atc cgc cgc aca tcc aag gca tga      936
Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala
305                310

```

<210> 10

<211> 936

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H305

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(933)

<223>

<400> 10

```

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc      48
Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly
1                5                10                15

ctg cac cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc      96
Leu His Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe
                20                25                30

tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag      144
Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys
                35                40                45

gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc      192
Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg
50                55                60

gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc acg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg      240
Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Thr Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu
65                70                75                80

gag tcg gag agc acc gcc cag atc acc aat acc ggc agc tac tcc gac      288
Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp
                85                90                95

tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc      336

```


ES 2 395 945 T3

Tyr	Ser	Met	Cys	Tyr	Ser	Met	Gly	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Phe	Pro	Ser	
			100					105					110			
ggt	gac	ttc	gag	cgg	atc	tgg	acc	cag	tac	ttc	gac	cgc	cag	tac	acc	384
Gly	Asp	Phe	Glu	Arg	Ile	Trp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Asp	Arg	Gln	Tyr	Thr	
		115					120					125				
gcc	tcc	cgc	gcg	gtc	gcc	cgg	gag	gtc	ctg	cgg	gcg	acc	ggg	acc	gag	432
Ala	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	Arg	Glu	Val	Leu	Arg	Ala	Thr	Gly	Thr	Glu	
		130				135						140				
ccc	gac	ggc	ggg	gtc	gag	gcc	ttc	ctc	gac	tgc	gag	ccg	ctg	ctg	cgg	480
Pro	Asp	Gly	Gly	Val	Glu	Ala	Phe	Leu	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Leu	Arg	
145					150				155						160	
ttc	cgc	tac	ttc	ccg	cag	gtc	ccc	gag	cac	cgc	agc	gcc	gag	gag	cag	528
Phe	Arg	Tyr	Phe	Pro	Gln	Val	Pro	Glu	His	Arg	Ser	Ala	Glu	Glu	Gln	
				165					170					175		
ccc	ctg	cgg	atg	gcg	ccg	cac	tac	gac	ctg	tcg	atg	gtc	acc	ctc	atc	576
Pro	Leu	Arg	Met	Ala	Pro	His	Tyr	Asp	Leu	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Ile	
			180					185					190			
cag	cag	aca	ccc	tgc	gcc	aac	ggc	ttc	gtc	agc	ctc	cag	gcc	gag	gtc	624
Gln	Gln	Thr	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Phe	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Val	
		195					200					205				
ggc	ggc	gcg	ttc	acg	gac	ctg	ccc	tac	cgt	ccg	gac	gcc	gtc	ctc	gtc	672
Gly	Gly	Ala	Phe	Thr	Asp	Leu	Pro	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Val	
		210				215					220					
ttc	tgc	ggc	gcc	atc	gcg	acc	ctg	gtg	acc	ggc	ggc	cag	gtc	aag	gcc	720
Phe	Cys	Gly	Ala	Ile	Ala	Thr	Leu	Val	Thr	Gly	Gly	Gln	Val	Lys	Ala	
225					230					235					240	
ccc	cgg	cac	cat	gtc	gcg	gcc	ccc	cgc	agg	gac	cag	ata	gcg	ggc	agc	768
Pro	Arg	His	His	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Asp	Gln	Ile	Ala	Gly	Ser	
				245					250					255		
agc	cgc	acc	tcc	agt	gtg	ttc	ttc	ctc	cgt	ccc	aac	gcg	gac	ttc	acc	816
Ser	Arg	Thr	Ser	Ser	Val	Phe	Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Ala	Asp	Phe	Thr	
			260					265					270			
ttc	tcc	gtc	ccg	ctg	gcg	cgc	gag	tgc	ggc	ttc	gat	gtc	agc	ctg	gac	864
Phe	Ser	Val	Pro	Leu	Ala	Arg	Glu	Cys	Gly	Phe	Asp	Val	Ser	Leu	Asp	
		275					280					285				
ggc	gag	acc	gcc	acg	ttc	cag	gat	tgg	atc	ggg	gtc	aac	tac	gtg	aac	912
Gly	Glu	Thr	Ala	Thr	Phe	Gln	Asp	Trp	Ile	Gly	Val	Asn	Tyr	Val	Asn	
		290				295					300					
atc	cgc	cgc	aca	tcc	aag	gca	tag									936
Ile	Arg	Arg	Thr	Ser	Lys	Ala										
305					310											

<210> 11

<211> 939

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H307

<220>

ES 2 395 945 T3

<221> exón

<222> (1)..(936)

<223>

<400> 11

atg acg gac gcg acc gtg ccg acc ttc gat ctg gcc gag ctg cgt gag	48
Met Thr Asp Ala Thr Val Pro Thr Phe Asp Leu Ala Glu Leu Arg Glu	
1 5 10 15	
ggc ttg cac cag gag gag ttc cgc cac tgc ctg cgc gag aag ggc gtg	96
Gly Leu His Gln Glu Glu Phe Arg His Cys Leu Arg Glu Lys Gly Val	
20 25 30	
ttc tac ctc aag ggc acc ggg ctc gcc gag gcg gac cac gcc tcg gcg	144
Phe Tyr Leu Lys Gly Thr Gly Leu Ala Glu Ala Asp His Ala Ser Ala	
35 40 45	
cgg gag atc gcg gtg gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag	192
Arg Glu Ile Ala Val Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys	
50 55 60	
cgc gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc acg cgc cgc ggc ttc acc ggg	240
Arg Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Thr Arg Arg Gly Phe Thr Gly	
65 70 75 80	
ctg gag tcg gag agc acc gcg cag atc acg aac acc ggc agc tac tcc	288
Leu Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser	
85 90 95	
gac tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg	336
Asp Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro	
100 105 110	
tcc ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac	384
Ser Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr	
115 120 125	
acc gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc	432
Thr Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr	
130 135 140	
gag ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg	480
Glu Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu	
145 150 155 160	
cgg ttc cgc tac ttc ccg cag gtg ccc gag gat cgc gtg gcc gag gag	528
Arg Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu Asp Arg Val Ala Glu Glu	
165 170 175	

ES 2 395 945 T3

cag ccg ctg cgg atg gcc ccg cac tac gac ctc tcg atc gtc acc ctg 576
 Gln Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Ile Val Thr Leu
 180 185 190

atc cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag 624
 Ile Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu
 195 200 205

gtc ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc 672
 Val Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu
 210 215 220

gtc ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag 720
 Val Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys
 225 230 235 240

gcc ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc 768
 Ala Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly
 245 250 255

agc agc cgc acc tcc agc gtg ttc ttc ctg cgc ccc aac ggg gac ttc 816
 Ser Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Gly Asp Phe
 260 265 270

cgc ttc tcg gtg ccg cgg gcc agg gag tgc ggg ttc gac gtc gcc ctg 864
 Arg Phe Ser Val Pro Arg Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asp Val Gly Leu
 275 280 285

gac ggc gag acc gcc acg ttc cgg gat tgg atc ggg ggc aac tac gtg 912
 Asp Gly Glu Thr Ala Thr Phe Arg Asp Trp Ile Gly Gly Asn Tyr Val
 290 295 300

aac atc cgc cgc aca tcc aag gca tag 939
 Asn Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala
 305 310

<210> 12

<211> 939

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H308

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(936)

<223>

<400> 12

atg acg gac gcg acc gtg ccg acc ttc gat ctg gcc gag ctg cgt gag 48
 Met Thr Asp Ala Thr Val Pro Thr Phe Asp Leu Ala Glu Leu Arg Glu
 1 5 10 15

ES 2 395 945 T3

ggc ttg cac cag gag gag ttc cgc cac tgc ctg cgc gag aag ggc gtg Gly Leu His Gln Glu Glu Phe Arg His Cys Leu Arg Glu Lys Gly Val 20 25 30	96
ttc tac ctc aag ggc acc ggg ctc gcc gag gcg gac cac gcc tcg gcg Phe Tyr Leu Lys Gly Thr Gly Leu Ala Glu Ala Asp His Ala Ser Ala 35 40 45	144
cgg gag atc gcg gtg gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag Arg Glu Ile Ala Val Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys 50 55 60	192
cgc gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg Arg Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly 65 70 75 80	240
ctg gag tcg gag agc acc gcg cag atc acg aac acc ggc agc tac tcc Leu Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser 85 90 95	288
gac tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg Asp Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro 100 105 110	336
tcc ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac Ser Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr 115 120 125	384
acc gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc Thr Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr 130 135 140	432
gag ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg Glu Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu 145 150 155 160	480
cgg ttc cgc tac ttc ccg cag gtg ccc gag gat cgc gtg gcc gag gag Arg Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu Asp Arg Val Ala Glu Glu 165 170 175	528
cag ccg ctg cgg atg gcc ccg cac tac gac ctc tcg atc gtc acc ctg Gln Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Ile Val Thr Leu 180 185 190	576
atc cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag Ile Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu 195 200 205	624
gtc ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc Val Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu 210 215 220	672
gtc ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag Val Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys 225 230 235 240	720
gcc ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc	768

ES 2 395 945 T3

Ala	Pro	Arg	His	His	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Asp	Gln	Ile	Ala	Gly	
				245					250					255		
agc	agc	cgc	acc	tcc	agc	gtg	ttc	ttc	ctg	cgc	ccc	aac	ggg	gac	ttc	816
Ser	Ser	Arg	Thr	Ser	Ser	Val	Phe	Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Gly	Asp	Phe	
			260					265					270			
cgc	ttc	tcg	gtg	ccg	cgg	gcc	agg	gag	tgc	ggg	ttc	aac	gtc	ggc	ctg	864
Arg	Phe	Ser	Val	Pro	Arg	Ala	Arg	Glu	Cys	Gly	Phe	Asn	Val	Gly	Leu	
			275				280					285				
gac	ggc	gag	acc	gcc	acg	ttc	cgg	gat	tgg	atc	ggg	ggc	aac	tac	gtg	912
Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Thr	Phe	Arg	Asp	Trp	Ile	Gly	Gly	Asn	Tyr	Val	
	290					295					300					
aac	atc	cgc	cgc	aca	tcc	aag	gca	tag								939
Asn	Ile	Arg	Arg	Thr	Ser	Lys	Ala									
305					310											

<210> 13

<211> 939

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H309

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(936)

<223>

<400> 13

atg	acg	gac	gcg	acc	gtg	ccg	acc	ttc	gat	ctg	gcc	gag	ctg	cgt	gag	48
Met	Thr	Asp	Ala	Thr	Val	Pro	Thr	Phe	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	
1			5					10					15			
ggc	ttg	cac	cag	gag	gag	ttc	cgc	cac	tgc	ctg	cgc	gag	aag	ggc	gtg	96
Gly	Leu	His	Gln	Glu	Glu	Phe	Arg	His	Cys	Leu	Arg	Glu	Lys	Gly	Val	
			20					25					30			
ttc	tac	ctc	aag	ggc	acc	ggg	ctc	gcc	gag	gcg	gac	cac	gcc	tcg	gcg	144
Phe	Tyr	Leu	Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Ala	Glu	Ala	Asp	His	Ala	Ser	Ala	
		35				40					45					
cgg	gag	atc	gcg	gtg	gac	ttc	ttc	gag	cac	ggc	agc	gag	gcg	gag	aag	192
Arg	Glu	Ile	Ala	Val	Asp	Phe	Phe	Glu	His	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	
	50				55			60								
cgc	gcc	gtc	acc	tcg	ccc	gtc	ccc	acc	acg	cgc	cgc	ggc	ttc	acc	ggg	240
Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Arg	Arg	Gly	Phe	Thr	Gly	
65					70					75				80		
ctg	gag	tcg	gag	agc	acc	gcg	cag	atc	acg	aac	acc	ggc	agc	tac	tcc	288
Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Gln	Ile	Thr	Asn	Thr	Gly	Ser	Tyr	Ser	

ES 2 395 945 T3

	85	90	95	
	gac tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg			336
	Asp Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro			
	100	105	110	
	tcc ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac			384
	Ser Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr			
	115	120	125	
	acc gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc			432
	Thr Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr			
	130	135	140	
	gag ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg			480
	Glu Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu			
	145	150	155	160
	cgg ttc cgc tac ttc ccg cag gtg ccc gag gat cgc gtg gcc gag gag			528
	Arg Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu Asp Arg Val Ala Glu Glu			
	165	170	175	
	cag ccg ctg cgg atg gcc ccg cac tac gac ctc tcg atc gtc acc ctg			576
	Gln Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Ile Val Thr Leu			
	180	185	190	
	atc cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag			624
	Ile Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu			
	195	200	205	
	gtc ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc			672
	Val Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu			
	210	215	220	
	gtc ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag			720
	Val Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys			
	225	230	235	240
	gcc ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc			768
	Ala Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly			
	245	250	255	
	agc agc cgc acc tcc agc gtg ttc ttc ctg cgc ccc aac ggg gac ttc			816
	Ser Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Gly Asp Phe			
	260	265	270	
	cgc ttc tcg gtg ccg cgg gcc agg gag tgc ggg ttc aac gtc ggc ctg			864
	Arg Phe Ser Val Pro Arg Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asn Val Gly Leu			
	275	280	285	
	gac ggc gag acc gcc acg ttc cgg gat tgg atc ggg ggc aac tac gtg			912
	Asp Gly Glu Thr Ala Thr Phe Arg Asp Trp Ile Gly Gly Asn Tyr Val			
	290	295	300	
	aac atc cgc cgc aca tcc aag gca tag			939
	Asn Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala			
	305	310		

<210> 14

<211> 5335

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 395 945 T3

<223> Plásmido de casete de expresión en Penicillium

<220>

<221> exón

<222> (930)..(1862)

5 <223> Secuencia codificante de expandasa

<400> 14

```

gaattcctta tactgggcct gctgcattgg tctgccattg cagggtatat atggctgacc      60
tggccaatct ccatcgagaa tctgggcgac tgaagaactg cccgcagaca agatggagac     120
tttcgtctag cacggctctag ggcagatccg atgccattgg ctctgtcaac tgtcgactac     180
atgtatctgc atgttgcacg gggaaatccc accacagggg cagccaagcg gccccgcgac     240
ttggcagtgg gcaaactacg cccgattctg gtgccaagaa ccgagaagaa tgagacagac     300
ccacgttgca ctctaaccgg atgctatcga cttacgggtg ctgaagattc aacacgctgc     360
aacgagagcc aaggtggtcc ggacattttc tacgtgcccg tttaccttgg aacatgcccg     420
tcgttgagtg cacgttgcct actctctcgt ggcttggtcg ggcccacgag cccgattgac     480
tcgaagggtg tacttgggta tctatggccc cgttttctgg cacggtaatg ataagtactt     540
actagtcttc gagcggggga gtggtgctct gcccgagcat caacgattgg cctgatcgca     600
ccgtctgcaa atgccacggt gcggaccgac tgaaatctca gaccaccaa gaccctccga     660
cttcgagata cggttactaa ttttacctg gctccagcgg ccccatccag taagcatctg     720
ggctgcaagc gtataatgtc tccaggttgt ctcagcataa acaccccgcc cccgctcagg     780
cacacaggaa gagagctcag gtcgtttcca ttgcgtccat actcttcaact cattgtcacc     840
tgcaggagaa cttcccctgt ccctttgcca agccctctct tcgctggtgt ccacgccttc     900
aagttttcac cattatTTTT ctagaccat atg gac acg acg gtg ccc acc ttc     953
                               Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe
                               1                               5

agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc ctg cgc cag gac gag ttc cgc agg     1001
Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly Leu Arg Gln Asp Glu Phe Arg Arg
   10                               15                               20

tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc     1049
Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr

```

ES 2 395 945 T3

25	30	35	40	
gac acc gag ctg aag tcg gcc aag gac atc gtc atc gac ttc ttc gag				1097
Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu	45	50	55	
cac ggc agc gag gcg gag aag cgc gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc				1145
His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr	60	65	70	
atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg gag tcg gag agc acc gcc cag att				1193
Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile	75	80	85	
acc aat acc ggc agc tac tcc gac tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc				1241
Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly	90	95	100	
acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc				1289
Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr	105	110	115	120
cag tac ttc gac cgc cag tac acc gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag				1337
Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu	125	130	135	
gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc				1385
Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe	140	145	150	
ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc				1433
Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro	155	160	165	
gag cac cgc agc gcc gag gag cag ccc ctg cgg atg gcg ccg cac tac				1481
Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr	170	175	180	
gac ctg tcg atg gtc acc ctc atc cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc				1529
Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly	185	190	195	200
ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc				1577
Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro	205	210	215	
tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg				1625
Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu	220	225	230	
gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc				1673
Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala Pro Arg His His Val Ala Ala Pro	235	240	245	
cgc agg gac cag ata gcg ggc agc agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc				1721
Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe	250	255	260	

ES 2 395 945 T3

ttatccggtactatcgtcttgagtcacaacccggtaagacacgacttaticcactggca3242
 gcagccactgtaacaggatagcagagcgaggatgtaggcggtgctacagagttcttg3302
 aagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatctggtatctgcgctctgctg3362
 aagccagttaccttcggaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgct3422
 ggtagcgggtgtttttttgttttcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaa3482
 gaagatcctttgatctttctacgggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacggttaa3542
 gggattttggctcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaa3602
 tgaagttttaaatcaatctaagtatatatgagtaaacttggctgacagttaccaatgc3662
 ttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctttcatccatagtgcctga3722
 ctccccgtctgttagataactacgatacgggagggcttacatctggcccagtgctgca3782
 atgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaaccagccagcc3842
 ggaagggccgagcgcagaagtgtgctctgcaactttatccgctccatccagtctattaat3902
 tgttgccgggaagctagagtaagtagtctccagttaatagtttgcgcaacgttggtgcc3962
 attgctacagcctcgtggtgtcacgctctcgctgttggtatggcttcattcagctccggt4022
 tcccaacgatcaaggcaggtacatgatcccctatgttgtgcaaaaaagcggtagctcc4082
 ttcggctctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgagtgttatcactcatgggtatg4142
 gcagcactgcataattctcttactgtcatgcatccgtaa gatgctttctgtgactggt4202
 gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctctgcccc4262
 gcgtcaatacgggataatacgcgcacatagcagaactttaaaagtgctcatcattgga4322
 aaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatcagttcgatg4382
 taaccactctgtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccagcgtttctggg4442
 tgagcaaaaa caggaaggcaaatgccgcaaaaaaggaa taaggcgacacggaaatgt4502
 tgaatactca tactcttctcttttcaatatattgaagca tttatcagggttattgtctc4562
 atgagcggat acatatttgaatgtatttagaaaaataaac aaataggggtcccgcgaca4622
 tttccccgaa aagtccacctgacgcgccctgtagggcgcatlaagcggcgggggtg4682
 gtggttacgcgcagcgtgacgcctacactgccagcgcctagcgcgccctcctttcgt4742
 ttcttcccttctttctcgcacggttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggg4802
 ctcccttagggtccgatttagtgcttta cggcacctcgacccccaaaaacttgattag4862
 ggtgatggtcacgtagtgggccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg4922

ES 2 395 945 T3

gagtccacgt	tctttaatag	tggactcttg	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	4982
tcggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	ttgccgattt	cggcctattg	gttaaaaaat	5042
gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgct	tacaatttcc	5102
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	5162
tacgccagct	ggcgaagg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccaggg	5222
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgagcg	cgcgtaatac	gactcactat	5282
agggcgaatt	gggtaccggg	ccccccctcg	agtgcggccg	caagcttgat	atc	5335

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una expandasa mutante que es una variante de un polipéptido modelo con actividad de expandasa mediante la que la treonina en la posición 89 de aminoácido en el péptido modelo se ha sustituido por lisina usando la numeración de las posiciones de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima expandasa como se representa en SEC ID NO: 1, y mediante la cual el polipéptido modelo con actividad de expandasa tiene la secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con SEC ID NO: 1.
- 10 2. Una expandasa mutante según la reivindicación 1, mediante la cual la expandasa mutante se ha modificado en la posición 89 de aminoácido como se describe en la reivindicación 1, y se ha modificado en al menos una posición de aminoácido seleccionada del grupo 1 que consiste en las posiciones 2, 18, 59, 73, 74, 90, 99, 101, 105, 112, 113, 155, 170, 177, 209, 213, 217, 244, 249, 251, 277, 278, 280, 281, 284, 293, 300, 307 y 311 usando la numeración de las posiciones de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima expandasa codificada por el gen *cefE* *Streptomyces clavuligerus* (SEC ID NO: 1).
- 15 3. Una expandasa mutante según la reivindicación 1, mediante la cual la expandasa mutante se ha modificado en la posición 89 de aminoácido como se describe en la reivindicación 1, y se ha modificado en al menos una posición de aminoácido seleccionada del grupo 2 que consiste en las posiciones 2, 18, 59, 90, 99, 101, 105, 112, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280, 284 y 293, opcionalmente en combinación con al menos una posición de aminoácido seleccionada del grupo 1 y que no pertenece al grupo 2.
- 20 4. Una expandasa mutante según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en:
 T89K+C281Y+T293K
 T89K+C281Y
 M73H+T89K+C281Y+A311D
 T89K+Y217H+C281Y+A311D
 T89K+H244R+C281Y+A311D
 25 T89K+C281Y+R307T+A311D
 T89K+C281Y+R307T+A311D
 M73I+T89K+C281Y+T293K+G300S+R307T+A311D
 T89K+C281Y+T293K+G300S+A311D
 T89K+C281Y+A311D
 30 M73H+T89K+T213A+C281Y+A311D
 T89K+R249C+C281Y+R306?+A311D
 T89K+C281Y+R306?+A311D
 y mediante la cual las mutaciones se introducen en SEC ID NO 1.
- 35 5. Un polinucleótido que codifica la expandasa mutante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Un vector de expresión o casete que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedante transformada con el polinucleótido de la reivindicación 5 o el vector o casete de la reivindicación 6.
8. Un método para producir la expandasa mutante de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar una célula hospedante según la reivindicación 7 en condiciones que conduzcan a la producción de la expandasa mutante, y, opcionalmente, recuperar el polipéptido.
- 40 9. Un método para producir un compuesto β -lactámico de interés, que comprende cultivar una célula hospedante según la reivindicación 7 en condiciones que conduzcan a la producción del compuesto β -lactámico, y, opcionalmente, recuperar el compuesto β -lactámico.
- 45 10. Un método según la reivindicación 9, que comprende además N-desacilar el compuesto β -lactámico para producir un compuesto β -lactámico N-desacilado.

11. Uso del polipéptido de expandasa mutante según la reivindicación 1 a 4 en la expansión del anillo penam en un anillo ceph-3-em.
12. Uso del polipéptido de expandasa mutante según la reivindicación 1 a 4 en la expansión del anillo penam de adipil-6-APA en un anillo ceph-3-em.
- 5 13. Uso según la reivindicación 11 en la producción de adipil-7-ADCA, adipil-7-ADAC o adipil-7-ACA.
14. Un microorganismo productor de adipil-6-APA transformado con un fragmento de ADN que codifica un polipéptido de expandasa alterado según la reivindicación 1 a 4.
15. Método para la producción fermentativa de adipil-7-ADCA, que comprende
- 10 (a) Cultivar un microorganismo capaz de producir adipil-6-APA y transformado con un fragmento de ADN que codifica una expandasa alterada según la reivindicación 1 a 4 en condiciones para producir adipil-6-APA
- (b) Convertir *in situ* el adipil-6-APA en adipil-7-ADCA usando la expandasa alterada; y
- (c) Aislar el adipil-7-ADCA deseado.
16. Método para la producción de 7-ADCA, que comprende
- 15 (a) Cultivar un microorganismo capaz de producir adipil-6-APA y transformado con un fragmento de ADN que codifica una expandasa alterada según la reivindicación 1 a 4 en condiciones para producir adipil-6-APA
- (b) Convertir *in situ* el adipil-6-APA en adipil-7-ADCA usando la expandasa alterada;
- (c) Aislar el adipil-7-ADCA deseado;
- (d) Eliminar la cadena lateral de adipilo para producir 7-ADCA; y
- (e) Recuperar 7-ADCA.

ES 2 395 945 T3

		10	20	30	40	50	
SULAEIN	1	50
NOCAEIN	1	50
309EIN	1	50
306EIN	1	50
307EIN	1	50
308EIN	1	50
262EIN	1	50
261EIN	1	50
127EIN	1	50
122EIN	1	50
111EIN	1	50
106EIN	1	50
101EIN	1	50
		60	70	80	90	100	
SOLAEIN	51	100
NOCAEIN	51	100
309EIN	51	100
308EIN	51	100
307EIN	51	100
306EIN	51	100
262EIN	51	100
261EIN	51	100
127EIN	51	100
122EIN	51	100
111EIN	51	100
106EIN	51	100
101EIN	51	100
		110	120	130	140	150	
SOLAEIN	101	150
NOCAEIN	101	150
309EIN	101	150
308EIN	101	150
307EIN	101	150
306EIN	101	150
262EIN	101	150
261EIN	101	150
127EIN	101	150
122EIN	101	150
111EIN	101	150
106EIN	101	150
101EIN	101	150
		160	170	180	190	200	
SOLAEIN	151	200
NOCAEIN	151	200
309EIN	151	200
308EIN	151	200
307EIN	151	200
306EIN	151	200
262EIN	151	200
261EIN	151	200
127EIN	151	200

Figura 1

122E1W	151	RAFDGSDPI	RSYDPOVPE	HRSAEGQELP	NRPHVDSRW	UTIQDSCAN	200
111E1W	151	RAFDGSDPI	RSYDPOVPE	HRSAEGQELP	NRPHVDSRW	UTIQDSCAN	200
100E1W	151	RAFDGSDPI	RSYDPOVPE	HRSAEGQELP	NRPHVDSRW	UTIQDSCAN	200
101E1W	151	RAFDGSDPI	RSYDPOVPE	HRSAEGQELP	NRPHVDSRW	UTIQDSCAN	200
		210	220	230	240	250	
80LAE1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
800AE1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
809E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
808E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
807E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
806E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
805E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
804E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
803E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
802E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
801E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
122E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
111E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
100E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
101E1W	201	GEVSLQAEVC	CAFTDIPYH	DAVIVRGGAT	ATLVIGGQVK	APRHHVZAPF	250
		260	270	280	290	300	
80LAE1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
800AE1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
809E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
808E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
807E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
806E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
805E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
804E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
803E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
802E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
801E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
122E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
111E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
100E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
101E1W	251	NDQIAGSBR	SSVETFRNF	DNFESVFPAS	REGH-VSDE	EPATE-SNIC	300
		310	320	330	340	350	
80LAE1W	301	SAVNERHNS	350
800AE1W	301	SAVNERHNS	350
809E1W	301	SAVNERHNS	350
808E1W	301	SAVNERHNS	350
807E1W	301	SAVNERHNS	350
806E1W	301	SAVNERHNS	350
805E1W	301	SAVNERHNS	350
804E1W	301	SAVNERHNS	350
803E1W	301	SAVNERHNS	350
802E1W	301	SAVNERHNS	350
801E1W	301	SAVNERHNS	350
122E1W	301	SAVNERHNS	350
111E1W	301	SAVNERHNS	350
100E1W	301	SAVNERHNS	350
101E1W	301	SAVNERHNS	350

Figura 1 (continuación)

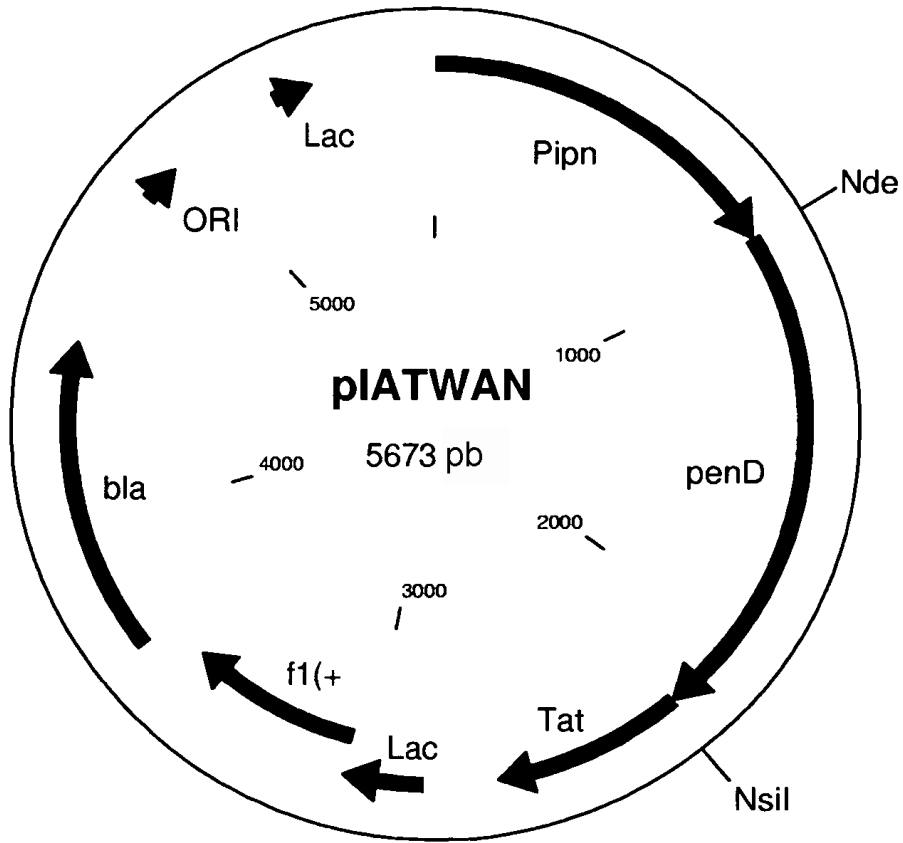


Figura 2

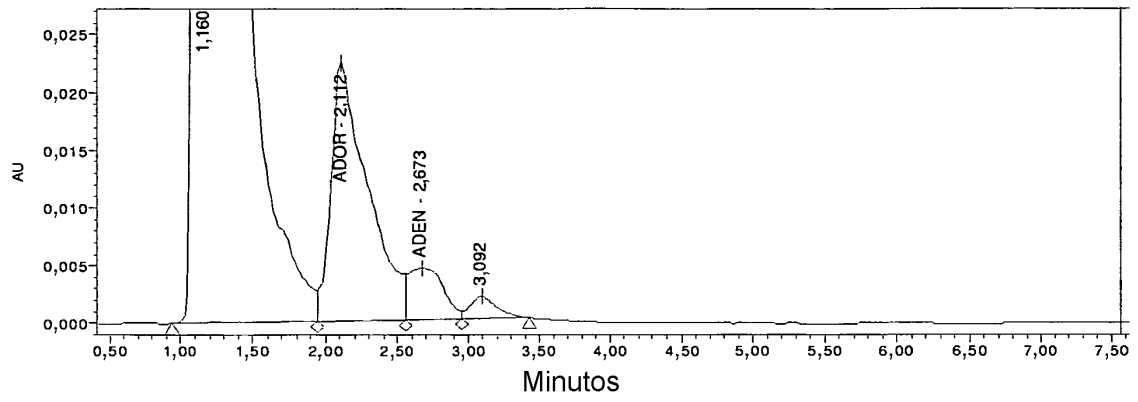


Figura 3A

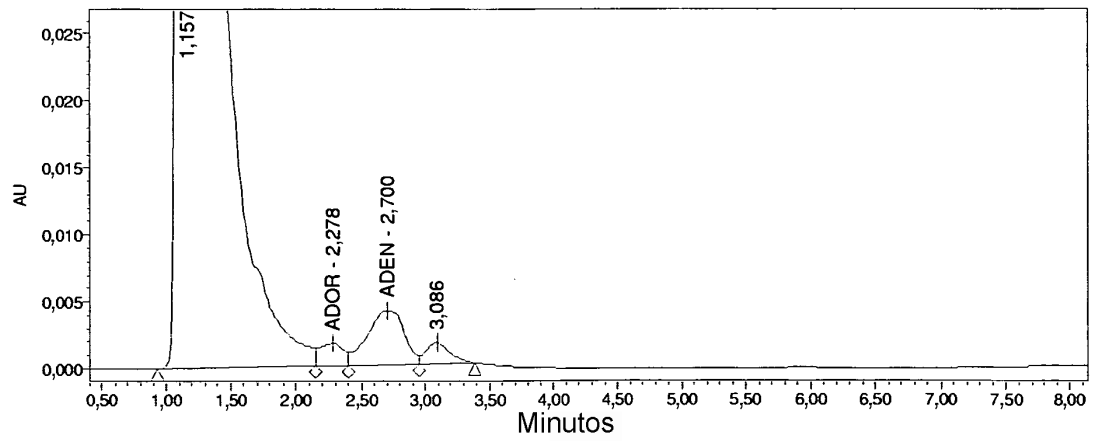


Figura 3B