

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 491**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2007 E 07820842 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2084270**

54 Título: **Producción de antibióticos de β -lactama**

30 Prioridad:

05.10.2006 EP 06121817

25.07.2007 EP 07113095

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

12.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HANS, MARCUS;
BOVENBERG, ROELOF ARY LANS;
KLAASSEN, PAUL;
VAN DER LAAN, JAN METSKE y
BOER, RÉMON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 447 491 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

Producción de antibióticos de β -lactama

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la producción de antibióticos de β -lactama.

10 **Antecedentes de la invención**

Los antibióticos de β -lactama son la familia mayor de metabolitos secundarios producidos en la naturaleza por parte de microorganismos. Las clases más importantes de los antibióticos de β -lactama, tanto clínica como económicamente, son las penicilinas (penam) y cefalosporinas (cefem). Su biosíntesis se produce a través de una vía compleja de etapas enzimáticas. Las primeras dos etapas son las etapas claves en las vías biosintéticas de las clases penam y cefem de antibióticos de β -lactama. Después de estas dos etapas, las vías biosintéticas hacia las penicilinas y cefalosporinas divergen. La primera etapa en la biosíntesis de los antibióticos penicilina, cefalosporina y cefamicina es la condensación de los isómeros L de tres aminoácidos, ácido L- α -amino-adípico (A), L-cisteína (C) y L-valina (V) en un tripéptido, δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina o ACV. Esta etapa es catalizada por la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa o ACVS. En la segunda etapa, el tripéptido ACV se cicla oxidativamente por la acción de isopenicilina N-sintasa (a la que se alude aquí en lo que sigue como IPNS) o ciclasa. El producto de esta reacción es isopenicilina N; este compuesto contiene las estructuras de anillo de β -lactama y tiazolidina típicas y posee actividad antibacteriana. A partir de isopenicilina N se forman las penicilinas G o V mediante intercambio de la cadena lateral de α -aminoadipilo hidrofílica por una cadena lateral hidrofóbica. Las cadenas laterales comúnmente utilizadas en procesos industriales son ácido fenilacético (PA), que proporciona penicilina G, o ácido fenoxiacético (POA), que proporciona penicilina V; esta reacción de intercambio es catalizada por la enzima aciltransferasa (AT).

Debido a la especificidad para el sustrato de la enzima AT no es posible intercambiar la cadena lateral de α -aminoadipilo por cualquier cadena lateral de interés, a pesar de que se demostró que podrían intercambiarse el ácido adípico y determinados tio-derivados del ácido adípico (véanse los documentos WO 95/04148 y WO 95/04149). En particular, las cadenas laterales penicilinas y cefalosporinas industrialmente importantes no pueden ser intercambiadas directamente a través de AT. Por consiguiente, la mayoría de los antibióticos de β -lactama actualmente utilizados se preparan por métodos semi-sintéticos. Estos antibióticos de β -lactama semi-sintéticos se obtienen modificando un producto de β -lactama N-sustituido mediante una o más reacciones químicas y/o enzimáticas. Estos métodos semi-sintéticos tienen la desventaja de que incluyen muchas etapas, son contaminantes del medio ambiente y son más bien costosos. Por lo tanto, sería muy deseable disponer de una vía completamente fermentativa hacia antibióticos de β -lactama, por ejemplo hacia amoxicilina, ampicilina, cefadroxil y cefalexina.

40 Se pueden pensar diversas opciones para una vía completamente fermentativa hacia antibióticos penam y cefem semi-sintéticos.

Por ejemplo, se podría centrar la atención al intercambio de la cadena lateral de α -aminoadipilo de isopenicilina N por la cadena lateral apropiada de interés, p. ej. la cadena lateral de α -amino-*p*-hidroxifenilacetilo en el caso de amoxicilina. Esto requeriría la modificación de la especificidad por el sustrato de la enzima AT, dado que la enzima nativa tiene una especificidad para el sustrato más bien estrecha y no es capaz de catalizar un intercambio de este tipo. Además, esto requeriría la modificación de la enzima CoA ligasa que activa la cadena lateral a ser intercambiada.

50 Alternativamente, se podría centrar la atención a la modificación de las primeras dos etapas en la vía biosintética de penicilina, de modo que la amoxicilina sea directamente sintetizada y secretada. Sin embargo, esto requeriría una modificación sustancial de las enzimas ACVS e IPNS.

Por ejemplo, para amoxicilina, primeramente se requeriría la producción de un tripéptido que produjera la cadena lateral de amoxicilina, es decir, el tripéptido D-*p*-hidroxifenilglicil-L-cisteinil-D-valina, en lugar de ACV. En segundo lugar, se requeriría que una enzima fuese capaz de ciclar este tripéptido.

60 ACVS es una péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) que cataliza la formación del tripéptido LLD-ACV (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina). En este tripéptido se forma un enlace péptido entre el grupo δ -carboxílico del ácido L- α -aminoadípico y el grupo amino de L-cisteína y, adicionalmente, la conformación estereoquímica de valina cambia de L a D.

En los últimos años, varios laboratorios e instituciones examinaron las opciones de la ingeniería dirigida de NRPS. Como estrategias principales, los dominios y módulos fueron intercambiados y, como consecuencia, se introdujeron nuevas especificidades que conducían a productos peptídicos cambiados. En la mayoría de los casos, las estrategias de ingeniería fueron restringidas a los fragmentos de enzima del mismo organismo (o incluso de la misma NRPS), limitando seriamente las opciones de una ingeniería de la enzima. Un problema principal de la ingeniería actual de la NRPS acometido en la bibliografía es el cambio de estereoquímica de un aminoácido del péptido, es decir, un cambio de la estereoquímica L a D. Un dominio de condensación formador de enlace peptídico, situado inmediatamente más abajo de un dominio de epimerización, es D-específico para el donante peptídico o aminoácido, y es L-específico para el aceptor aminoácido. Un dominio de condensación de este tipo se representa como ^DC_L. Un dominio ^LC_L en esta posición no proporciona la condensación de los restos del donante y aceptor (Clugston S.L. *et al.* 2003, *Biochemistry*, 42, 12095-12104). Un problema adicional que puede limitar las opciones de la ingeniería es que los dominios C y A se consideran como un par inseparable (Mootz H. D. *et al.* 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5848-5853).

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que es factible la ingeniería de ACVS para proporcionar una enzima tratada por ingeniería y es capaz de catalizar la formación de un tripéptido HpgCV o PgCV, en donde en el enlace peptídico N-terminal se utiliza un grupo α -carboxílico en lugar del grupo δ -carboxílico que se utiliza en el tripéptido ACV natural y, adicionalmente, que es capaz de modificar la configuración estereoquímica L del primer aminoácido a una configuración D.

Varios grupos han investigado adicionalmente la especificidad para el sustrato de la enzima IPNS. Para revisiones sobre este tema, véase Baldwin y Bradley, *Chem. Rev.* 1990, 90, 1079-1088 y Huffman *et al.* *J. Med. Chem.* 1992, 35, 1897-1914.

J. M. Luengo *et al.* (*Bio/Technol.* 1986, 4, 44) y T.R.M. Barends *et al.* (*Curr. Opin. Biotechnol.* 2004, 15, 356) describen el papel de IPNS en la formación de antibióticos de β -lactama a partir de tripéptidos. A pesar de que el primer documento menciona la ciclación directa de fenilacetil-cisteinil-valina para formar penicilina G mediante IPNS, no se mencionan otras conversiones y, a este respecto, es interesante señalar que Huffman *et al.* (*J. Med. Chem.* 1992, 35, 1897) informaron de la ausencia de actividad antibiótica cuando se utiliza *m*-COOH-DL-fenilglicil-L-cistenil-D-valina o *p*-hidroxifenilacetil-L-cistenil-D-valina como sustrato para IPNS. La posibilidad de modificar enzimas IPNS se menciona en el documento WO 98/16648, pero sin ninguna guía técnica.

Sorprendentemente, se encuentra también que la enzima IPNS nativa es capaz de actuar sobre los tripéptidos hidroxifenilglicil-cisteinil-valina (HpgCV) y fenilglicil-cisteinil-valina (PgCV), más particularmente sobre las variantes de DLD de estos tripéptidos. El hallazgo de esta característica de IPNS abre el camino a desarrollos ulteriores, entre los que se encuentra el rastreo de variantes de IPNS para aislar moléculas de IPNS con una actividad mejorada sobre estos péptidos no nativos. Los hallazgos de la presente invención permiten por vez primera una producción completamente fermentativa de antibióticos que anteriormente solamente podían ser obtenidos a través de vías semi-sintéticas.

Descripción detallada de la invención

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o un antibiótico de N- α -amino-fenilacetil- β -lactama, que comprende poner en contacto un tripéptido hidroxifenilglicil-cisteinil-valina (HpgCV) o un tripéptido fenilglicil-cisteinil-valina (PgCV) con una IPNS para efectuar la formación del antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o el antibiótico de N- α -amino-fenilacetil- β -lactama.

La presente invención muestra sorprendentemente, por vez primera, que la enzima IPNS es capaz de convertir los sustratos tripéptido HpgCV o PgCV no nativos, respectivamente, en compuestos de β -lactama con una cadena lateral de N- α -amino-hidroxifenilacetilo o una cadena lateral de N- α -amino-fenilacetilo, respectivamente, tal como amoxicilina o ampicilina, respectivamente.

De acuerdo con la invención, una "enzima IPNS" o una "enzima con actividad de IPNS" es una enzima que cicla un tripéptido HpgCV o PgCV para formar una molécula de antibiótico penam. Enzimas de IPNS de este tipo tienen típicamente un grado de identidad con la secuencia de aminoácidos de IPNS de *Emericella (Aspergillus) nidulans* de SEQ ID NO: 1 de al menos 50%.

Los aminoácidos hidroxifenilglicina (Hpg) y fenilglicina (Pg) en estos tripéptidos pueden estar en la forma D así como en la forma L, pero preferiblemente están en la forma D. La hidroxifenilglicina es preferiblemente *p*-hidroxifenilglicina.

La detección de esta actividad ciclante de tripéptidos no nativos de IPNS se realiza utilizando un bioensayo y/o utilizando el análisis LC/MS.

5 El desarrollo del bioensayo requería realizar diversas elecciones. Por ejemplo, se necesitaba seleccionar un microorganismo adecuado para someter a ensayo la actividad antibiótica. Además, se necesitaba seleccionar una IPNS adecuada, dado que enzimas IPNS de diferentes especies parecen diferir en su actividad y estabilidad específicas.

10 Ya que se ha detectado ahora la actividad ciclante de tripéptidos no nativos de IPNS como se menciona arriba, es posible optimizar las condiciones de reacción y rastrear variantes de IPNS en cuanto a enzimas con actividad específica mejorada y/o especificidad por el sustrato alterada.

15 La ciclación *in vitro* del tripéptido no nativo para dar un antibiótico penam se realiza típicamente utilizando las condiciones de reacción como se mencionan más adelante.

20 El pH de la mezcla de reacción puede oscilar entre 6 y 8, utilizando cualquier tampón adecuado. La mezcla de reacción debería contener, adicionalmente, una cantidad adecuada de iones Fe(II). Finalmente, la presencia de un agente reductor, por ejemplo DTT o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) es necesaria para mantener al tripéptido precursor en un estado reducido. Preferiblemente, el tripéptido precursor se trata previamente con un agente reductor adecuado de este tipo.

25 Opcionalmente, el antibiótico penam formado tal como amoxicilina o ampicilina, se puede convertir adicionalmente para producir un compuesto de antibiótico cefem. Esta conversión requiere al menos la enzima expandasa, por ejemplo para formar cefadroxil o cefalexina. Opcionalmente, se pueden formar otros compuestos de cefem mediante conversiones adicionales de enzimas utilizando, por ejemplo, las actividades de enzimas hidroxilasa y acetil-transferasa, o las actividades de enzimas hidroxilasa y carbamoiltransferasa. Las enzimas necesarias para estas conversiones se pueden obtener adecuadamente a partir de microorganismos productores de cefem, tales como *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans* o *Acremonium chrysogenum*. Para una revisión reciente, véase Liras y Martin, International Microbiology (2006), 9: 9-19.

30 En una realización preferida de la invención, se utiliza una enzima IPNS tal como se describe más adelante en esta memoria.

35 En una realización, como compuestos de partida en el procedimiento se utilizan tripéptidos HpgCV y PgCV hechos a medida. En otra realización, los tripéptidos HpgCV y PgCV se producen en un procedimiento que comprende i) poner en contacto los aminoácidos hidroxifenilglicina (Hpg) o fenilglicina (Pg), cisteína (C) y valina (V) con una péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) para efectuar la formación del tripéptido hidroxifenilglicil-cisteinil-valina (HpgCV) o fenilglicil-cisteinil-valina (PgCV).

40 La NRPS para uso en esta realización es una NRPS no natural con una estructura modular que comprende tres módulos, un primer módulo M1 específico para Hpg o Pg, un segundo módulo M2 específico para C y un tercer módulo M3 para V, según se describe más adelante en esta memoria.

45 El proceso global para la producción de un antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o un antibiótico de N- α -aminofenilacetil- β -lactama a partir de sus aminoácidos precursores comprende, por lo tanto, i) poner en contacto los aminoácidos hidroxifenilglicina (Hpg) o fenilglicina (Pg), cisteína (C) y valina (V) con una pepetido sintetasa no ribosomal (NRPS) para efectuar la formación del tripéptido hidroxifenilglicil-cisteinil-valina (HpgCV) o fenilglicil-cisteinil-valina (PgCV) y ii) poner en contacto dichos tripéptidos con IPNS para efectuar la formación del antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o el antibiótico de N- α -amino-fenilacetil- β -lactama.

50 Los procedimientos se pueden realizar *in vivo* utilizando una cepa microbiana adecuadamente tratada mediante ingeniería, según se describe en esta memoria más adelante.

55 En un segundo aspecto de la invención, se proporcionan polipéptidos de IPNS variantes que se modifican en comparación con un polipéptido IPNS parental y que tienen una actividad ciclante mejorada sobre un tripéptido HpgCV o PgCV en comparación con la IPNS parental.

60 Una "actividad mejorada" de una enzima IPNS variante de acuerdo con la invención es una actividad que asegura la producción de al menos 2 veces la cantidad de actividad antibiótica a partir del tripéptido precursor en comparación con la IPNS parental, preferiblemente al menos 5 veces la cantidad, preferiblemente al menos 10 veces la cantidad. Si la IPNS parental tiene una actividad no detectable sobre el péptido precursor, una actividad mejorada abarca cualquier actividad medible por enzima del límite de detección.

Posiciones adecuadas para la modificación en una IPNS parental se pueden seleccionar en base a los criterios de a) crear espacio en el centro activo y/o b) debilitar la unión del extremo C al sitio activo. El extremo C de la molécula de IPNS actúa como un cuasi-sustrato cuando la enzima no está cargada con un sustrato y, por lo tanto, compite con el sustrato por la unión al sitio activo. Tras la aproximación del sustrato al centro activo, el extremo C se retira, creando espacio para el sustrato. Así, puede ser beneficioso desplazar esta competición en favor de la unión del sustrato.

La IPNS parental puede proceder de cualquier fuente microbiana adecuada, según se menciona más adelante en esta memoria.

Una modificación puede ser una sustitución de un aminoácido particular en la o las posiciones indicadas para un aminoácido diferente, puede ser una inserción de un aminoácido en la o las posiciones indicadas o puede ser una delección de un aminoácido de la o las posiciones indicadas.

Otra enzima IPNS variante particular de la invención, cuando se alinea con una IPNS de SEQ ID NO: 1, se modifica en comparación con una enzima IPNS parental en al menos la posición 185 y, opcionalmente, en al menos una de las siguientes posiciones, utilizando la numeración de posiciones de SEQ ID NO: 1: 91, 104, 183, 190, 321, 324, 325, 331, y es capaz de convertir el tripéptido HpgCV o PgcCV, respectivamente, en el antibiótico amoxicilina o ampicilina, respectivamente. Modificaciones en estas posiciones desplazan la competición entre el sustrato y los residuos C-terminales Q330-T331 de IPNS por la unión en el sitio activo a favor del sustrato, debilitando la unión del extremo C al sitio activo y/o estabilizando la conformación en la que el sitio activo está disponible para la unión al sustrato. Sorprendentemente, se demostró que la modificación en al menos la posición 185 confiere una actividad de ciclación altamente mejorada a la enzima IPNS que contiene la modificación en comparación con una IPNS parental que no contiene la modificación.

Una variante de acuerdo con la invención comprende la modificación 185RKH. El aminoácido original en la posición 185 depende de la IPNS parental que se utiliza, por ejemplo puede ser S, T o V.

En una realización, la modificación 185RKH se combina con una modificación en al menos una de las posiciones 91, 104, 183, 190, 321, 324, 325, 331, según se menciona en la tabla que figura a continuación. En particular, R y K pueden interactuar favorablemente con el T331 C-terminal cuando la región N-G-Q-T331 C-terminal ha adoptado la conformación activa. Sorprendentemente, la interacción entre 185RK y T331 es muy beneficiosa para aumentar la actividad para HpgCV y PgcCV. Probablemente, 185RK favorece la formación de la conformación activa, utilizando HpgCV y PgcCV como sustratos.

Nativa*	Modificaciones preferidas	Modificaciones particularmente preferidas
Y91	H F	F
C104	A V S T L I	V T L I
183	A C V T L I	A C T
P190	G A V N D Q E S T K R Y	A V S T
321	A I M Q	A M Q
L324	N D S T V A	N D
I325	A L N Q E M	L M Q
T331	G A V S C	C S

*En esas posiciones en las que se especifica un aminoácido, el aminoácido particular conservado dentro de todas las enzimas IPNS nativas conocidas hasta la fecha.

En la presente invención, una denotación tal como, p. ej., "185RK" significa que el aminoácido en la posición 185 de la IPNS parental en cuestión está sustituido con R o K, o que en la posición 185 de la IPNS parental R o K están insertadas cuando en la IPNS parental no está presente aminoácido alguno en esta posición. La naturaleza del residuo aminoácido original dependerá de la IPNS parental que se utilice. Una denotación tal como, p. ej., "VST185RK" significa que un residuo aminoácido específico en la posición 185 presente en la IPNS parental, en este ejemplo V, S o T, está sustituido con un aminoácido diferente, en este ejemplo R o K.

Una IPNS parental adecuada es un polipéptido de IPNS obtenible a partir de un organismo fúngico o bacteriano capaz de producir β-lactamas. Una IPNS parental preferida es una IPNS obtenible de *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus (Emericella) nidulans*, *Streptomyces jumonjinensis*, *Nocardia lactamdurans*, *Streptomyces microflavis*, *Lysobacter lactamgenus*, especies de *Flavobacterium*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces griseus* y/o *Streptomyces cattleya*. Una IPNS parental especialmente preferida se puede obtener a partir de *Streptomyces clavuligerus* y/o *Aspergillus (Emericella) nidulans*. Típicamente, una IPNS parental de este tipo es un polipéptido con actividad de IPNS que tiene un grado de identidad de al menos 50%, preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al

menos 70%, más preferiblemente al menos 75% o más preferiblemente al menos 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Además de las modificaciones arriba recogidas, preferiblemente la modificación 185RKH, el polipéptido de IPNS puede comprender modificaciones adicionales que conciernen a las posiciones en el polipéptido en donde una modificación no afecta sustancialmente al plegamiento o actividad del polipéptido. Típicamente, modificaciones de este tipo pueden ser modificaciones conservativas, por ejemplo sustituciones en donde un aminoácido no polar, polar no cargado, polar cargado o aromático está sustituido con un aminoácido diferente de la misma categoría, o pueden ser debidas a variación entre cepas o entre especies. Polipéptidos que tienen modificaciones adicionales de este tipo tienen típicamente un grado de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 1 de al menos 50%.

Así, en una realización, el polipéptido que tiene actividad de IPNS y que comprende al menos una de las modificaciones tal como las recogidas anteriormente, tiene un grado de identidad de al menos 50%, preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, o preferiblemente al menos 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Las expresiones “homología” o “porcentaje de identidad” se utilizan de manera indistinta en esta memoria. Para el fin de esta invención, se define aquí que, con el fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej. en cada una de las secuencias se pueden introducir huecos para la alineación óptima). Los residuos aminoácidos en las posiciones de aminoácido correspondientes se comparan después. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido que la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones solapantes que incluyen huecos) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias son de la misma longitud.

La persona experta será consciente del hecho de que están disponibles varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede conseguir utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. La persona experta apreciará que todos estos diferentes parámetros proporcionarán resultados ligeramente distintos, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se ve significativamente alterado cuando se utilizan diferentes algoritmos. Preferiblemente, la matriz es una matriz Blossom 62 con un peso del hueco de 10,0 y un peso de longitud de 0,5.

Las secuencias de proteínas de la presente invención se pueden utilizar adicionalmente como una “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas, por ejemplo para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Búsquedas de este tipo se pueden realizar utilizando los programas blastp, psi-blast, phi-blast y tblastn (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Cuando se utilizan los programas blastp, psi-blast, phi-blast y tblastn se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., los programas blastp, psi-blast, phi-blast y tblastn). Véase la página de inicio del National Center for Biotechnology Information en www.ncbi.nlm.nih.gov.

En un tercer aspecto, se proporciona un polipéptido que es un péptido sintetasa no ribosomal que comprende tres módulos, un primer módulo M1 específico para Hpg o Pg, un segundo módulo M2 específico para C y un tercer módulo M3 específico para V. Con la expresión “específico para” un aminoácido para caracterizar un módulo, se quiere dar a entender que el módulo particular permite la incorporación del aminoácido indicado. El primer módulo M1 permite la incorporación de un primer aminoácido L-*p*-hidroxifenilglicina o L-fenilglicina y, preferiblemente, su conversión en el correspondiente D-aminoácido. El segundo módulo M2 permite la incorporación del aminoácido L-cisteína al tiempo que es acoplado al aminoácido Hpg o Pg. En particular, cuando el aminoácido Hpg o Pg se encuentra en su forma D, el módulo M2 específico para C comprende un dominio ^DC_L que está fusionado a un dominio A que es heterólogo con el anterior. El tercer módulo M3 permite la incorporación del aminoácido L-valina y su conversión en el correspondiente D-aminoácido. De esta manera, la péptido sintetasa cataliza la formación de un tripéptido DLD hidroxifenilglicil-cisteinil-valina (HpgCV) o fenilglicil-cisteinil-valina (PgCV) a partir de sus precursores de L-aminoácido Hpg o Pg, C y V.

El término “módulo”, tal como se utiliza en la presente invención, define una unidad catalítica que permite la

incorporación de un bloque formador de péptidos, habitualmente un aminoácido, en el producto, habitualmente un péptido, y puede incluir dominios para modificaciones tales como epimerización y metilación.

5 Cada uno de los módulos de una NRPS está compuesto por los denominados “dominios”, siendo cada uno de los dominios responsable de una etapa de reacción específica en la incorporación de un bloque de formación de péptidos. Cada módulo contiene al menos un dominio de adenilación (dominio A), responsable del reconocimiento y la activación de un aminoácido dedicado, y un dominio de tiolación (dominio T o PCP), responsable del transporte de compuestos intermedios a los centros catalíticos. El segundo módulo y módulos adicionales contienen, además, un dominio de condensación (dominio C), responsable de la formación del enlace peptídico, y el último módulo
10 contiene, además, un dominio de terminación (dominio TE) responsable de la liberación del péptido. Opcionalmente, un módulo puede contener dominios adicionales tales como un dominio de epimerización (dominio E), responsable de la conversión de la forma L del aminoácido incorporado en la forma D. Véase, Sieber S. A. *et al.* 2005, *Chem. Rev.*, 105, 715-738, para una revisión de la estructura modular de NRPS.

15 Una fuente adecuada para el módulo M1 de la péptido sintetasa híbrida es una enzima NRPS que cataliza la formación de un péptido que comprende el aminoácido X, en donde X es Hpg o Pg a incorporar como primer aminoácido en el tripéptido XCV. Así, un módulo M1 adecuado se selecciona teniendo en cuenta la naturaleza del aminoácido a incorporar como primer aminoácido del tripéptido. En particular, el dominio A de un módulo, determina la selectividad para un aminoácido particular. Así, un módulo M1 puede seleccionarse en base a la especificidad de
20 un dominio A para el aminoácido a incorporar. Una selección de este tipo puede producirse de acuerdo con el motivo distintivo determinante de la especificidad de dominios A según se define por Stachelhaus T. *et al.* 1999, *Chem & Biol.*, 8, 493-505.

25 El módulo M1 no necesita contener dominio C y un dominio TE, ya que es el primer módulo de NRPS. Así, si está presente en el módulo fuente, un dominio C y/o un dominio TE pueden ser adecuadamente separados para obtener un primer módulo M1 sin un dominio C y/o un dominio TE. Además, de un dominio A y un dominio T, el módulo M1 de la NRPS debería contener un dominio E si un L-aminoácido necesita convertirse en un D-aminoácido. Por lo tanto, si no está presente en el módulo fuente, un dominio E se fusiona al dominio T del módulo fuente para obtener
30 un primer módulo M1 que contiene un dominio A, T y E.

En general, la especificidad del módulo M1 de la NRPS para p-hidroxifenilglicina o fenilglicina se puede juzgar por datos experimentales y/o se puede basar en el motivo distintivo determinante de la especificidad de dominios A publicado por Stachelhaus T. *et al.* 1999, *Chem & Biol.*, 8, 493-505.

35 Preferiblemente, un primer módulo M1 con especificidad para p-hidroxifenilglicina se puede obtener a partir de una CDA (antibiótico calcio-dependiente) sintetasa, en particular es el sexto módulo de una CDA sintetasa (la numeración de los módulos de CDA sintetasa se proporciona según se publica por Hojati Z. *et al.* 2002, *Chem. & Biol.*, 9, 1175-1187). Preferiblemente, la CDA sintetasa se puede obtener a partir de *Streptomyces coelicolor*. Alternativamente, módulos específicos para Hpg se pueden obtener a partir de una cloroerenomicina sintetasa, en particular el cuarto y quinto módulos de una cloroerenomicina sintetasa, preferiblemente una cloroerenomicina sintetasa obtenible de *Amycolatopsis orientalis* (Trauger, J. W. *et al.* 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 3112-3117), o a partir de una complestatina sintetasa, en particular es el séptimo módulo de una complestatina sintetasa, preferiblemente una complestatina sintetasa obtenible de *Streptomyces lavendulae* (Chiu H.T. *et al.* 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 8548-8553). Todos estos módulos tienen especificidad para L-Hpg y la convierten en el D-estereoisómero.
45

Preferiblemente, un primer módulo M1 con especificidad para fenilglicina se puede obtener a partir de una pristinamicina sintetasa, en particular es el módulo C-terminal de la proteína SnbD de pristinamicina sintetasa, según se publica en Thibaut, D. *et al.* 1997, *J. Bact.* 179, 697-704. Preferiblemente, la pristinamicina sintetasa se puede obtener a partir de *Streptomyces pristinaspiralis*.
50

El módulo fuente C-terminal, procedente de pristinamicina sintetasa, contiene un dominio TE y no contiene un dominio E. Para preparar un módulo que funcione como un primer módulo en la péptido sintetasa de la invención, el dominio TE se separa adecuadamente del módulo fuente C-terminal y un dominio E se fusiona al dominio T del módulo C-terminal así modificado. Un dominio E se puede obtener a partir de cualquier NRPS adecuada, por ejemplo a partir de otro módulo de la misma enzima NRPS, o también a partir de un módulo de una enzima NRPS diferente con especificidad para el aminoácido similar (p. ej. p-hidroxifenilglicina o fenilglicina) o diferente del dominio de adenilación. Preferiblemente, el dominio E se puede obtener a partir de una CDA sintetasa de *Streptomyces coelicolor*, preferiblemente del sexto módulo, según se especifica arriba. Así, en esta realización, el
55 módulo M1 de la NRPS es un módulo Híbrido.
60

El segundo módulo M2 de la péptido sintetasa debería permitir la incorporación del aminoácido cisteína como

segundo aminoácido en el tripéptido DLD-XCV, en donde X es Hpg o Pg. La selección de este módulo puede basarse en el motivo distintivo determinante de la especificidad de dominios A según se publica por Stachelhaus T. *et al.* 1999.

5 Para permitir el acoplamiento del aceptor L-cisteinilo al donante D-X-aminoácido, el dominio C del módulo M2 es un dominio ^DC_L (tal como se menciona antes y como se explica en Clugston S.L. *et al.* 2003). Este dominio ^DC_L se fusiona a un dominio A que es heterólogo con el mismo. El término "heterólogo", tal como se utiliza en este contexto, significa que los dominios C y A son de diferentes módulos. Estos diferentes módulos pueden ser de la misma enzima o pueden ser de enzimas diferentes. Preferiblemente, el dominio A se puede obtener a partir del
10 segundo módulo de una ACVS. Sorprendentemente, el módulo M2 Híbrido que comprende una configuración del dominio ^DC_L-A de este tipo parece ser capaz de la incorporación del aminoácido cisteína.

15 En una realización preferida, el ^DC_L del módulo M2 se puede obtener a partir del módulo situado inmediatamente aguas abajo del módulo que es la fuente del primer módulo M1 de la péptido sintetasa de la invención. Por ejemplo, el dominio ^DC_L del módulo M2 de la péptido sintetasa es el dominio ^DC_L del séptimo módulo de la CDA sintetasa que es la fuente del primer módulo M1.

20 En otra realización, el dominio ^DC_L del módulo M2 de la péptido sintetasa es el dominio ^DC_L del segundo módulo de la proteína iturina sintetasa ItuC de *Bacillus subtilis* RB14, según se define por Tsuge K. *et al.* 2001, *J. Bact.*, 183, 6265-6273.

25 En una realización preferida de la invención, el segundo módulo M2 de la péptido sintetasa se puede obtener, al menos en parte, a partir de la enzima que es la fuente del tercer módulo M3 de la péptido sintetasa. En particular, los dominios A y T del módulo M2 de la péptido sintetasa se pueden obtener a partir del módulo situado inmediatamente aguas arriba del módulo que es la fuente del tercer módulo de la péptido sintetasa de la invención. Por ejemplo, los dominios A y T del módulo M2 de la péptido sintetasa pueden ser los dominios A y T del segundo módulo de una ACVS.

30 El tercer módulo M3 de la péptido sintetasa debería permitir la incorporación del aminoácido valina como tercer aminoácido del tripéptido, así como su conversión en la forma D para proporcionar el tripéptido DLD-XCV.

En una realización preferida de la invención, el tercer módulo de la péptido sintetasa se puede obtener a partir de una ACVS, en particular es el tercer módulo de una ACVS.

35 La ACVS, según se menciona antes, es preferiblemente una ACVS bacteriana o fúngica, más preferiblemente una ACVS bacteriana que se puede obtener de *Nocardia lactamdurans*, o una ACVS fúngica que se puede obtener de un hongo filamentoso tal como *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*.

40 Los módulos M1, M2 y M3 de la péptido sintetasa pueden tener las secuencias de aminoácidos tal como se muestra más adelante. Sin embargo, estas secuencias se muestran meramente como ejemplos y no pretenden limitar el alcance de la invención. La persona experta apreciará que los dominios A de NRPS, por ejemplo, comparten aproximadamente el 30-60% de la identidad de la secuencia de aminoácidos, incluso dominios A con especificidad para el mismo aminoácido pero de una fuente diferente, y comprenden varios motivos del núcleo entre los que se encuentra un motivo distintivo determinante de la especificidad (Stachelhaus T. *et al.* 1999).
45

El módulo M1 de la péptido sintetasa, por ejemplo, tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad de al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 50%, lo más preferiblemente al menos 60% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Módulos de polipéptidos de este tipo con un porcentaje de identidad de al menos 30% se denominan también secuencias homólogas u homólogos.
50

El módulo M2 de la péptido sintetasa, por ejemplo, tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad de al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 50%, lo más preferiblemente al menos 60% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.
55

El módulo M3 de la péptido sintetasa, por ejemplo, tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad de al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 50%, lo más preferiblemente al menos 60% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
60

Los módulos de la péptido sintetasa se pueden obtener a partir de enzimas NRPS naturales según se especifica antes, o se pueden derivar de enzimas NRPS naturales de este tipo mediante técnicas de mutagénesis tales como

mutagénesis aleatoria y/o dirigida al sitio y/o barajeo de genes. Si es necesario, el módulo fuente puede ser tratado adicionalmente mediante ingeniería para añadir dominios necesarios, suprimir dominios innecesarios o sustituir un dominio por un dominio correspondiente de otro módulo. Típicamente, el dominio A de un módulo determina la especificidad para un aminoácido particular, mientras que los dominios E y C pueden obtenerse a partir de cualquier módulo de elección. Por ejemplo, en una situación en la que el módulo fuente seleccionado para la incorporación del primer aminoácido X no es un primer módulo (módulo M1) en la enzima fuente y, por lo tanto, comprende un dominio C, el dominio C del módulo fuente puede ser suprimido. En una situación en la que el módulo fuente no contiene un dominio E, aun cuando se desea una epimerización del aminoácido incorporado, se puede añadir un dominio E adecuado.

Enzimas NRPS tratadas mediante ingeniería se pueden construir mediante fusión de los dominios y/o módulos apropiados en el orden apropiado. También es posible intercambiar un módulo o dominio de una enzima por un módulo o dominio adecuado de otra enzima. Esta fusión o intercambio de dominios y/o módulos puede hacerse utilizando técnicas de ingeniería genética comúnmente conocidas en la técnica. La fusión de dos dominios o módulos diferentes puede hacerse típicamente en las regiones de enlazador que están presentes entre módulos o dominios. Véase, por ejemplo, el documento EP 1 255 816 y Mootz H.D. *et al.* 2000 que describen estos tipos de construcciones. Parte o la totalidad de las secuencias también se puede obtener mediante síntesis a medida de la o las secuencias de polinucleótidos apropiadas.

Por ejemplo, la fusión de un fragmento de tri-dominio ATE de un módulo NRPS específico para Hpg al fragmento bi-modular específico para Cys-Val de una ACVS se puede hacer como sigue. El fragmento ATE de un módulo específico para Hpg se puede aislar mediante digestión con enzimas de restricción del correspondiente gen NRPS en las posiciones de enlazador, más específicamente entre el dominio C y el dominio A del módulo específico para Hpg, en el caso de un módulo C-terminal, o entre el dominio C y el dominio A del módulo específico para Hpg y entre el dominio E y el subsiguiente dominio (dominio C o TE) en el caso de un módulo de alargamiento interno. El fragmento Cys-Val bi-modular de ACVS se puede obtener 1) dejando el extremo C intacto y 2) intercambiando el dominio C del módulo 2 específico para Cys por un dominio C que tiene especificidad para ^DCL. En analogía al aislamiento del fragmento ATE se puede aislar un fragmento de cuatro dominios ATEC que incluye el dominio C del módulo adyacente situado más abajo. Este último se fusiona al fragmento Cys-Val bi-modular de ACVS sin el dominio C situado más arriba.

Las enzimas NRPS según se describen en esta memoria se pueden someter adecuadamente a técnicas de mutagénesis, p. ej. para mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas.

Polipéptidos según se describen en esta memoria se pueden producir por medios sintéticos, a pesar de que habitualmente se prepararán de modo recombinante mediante la expresión de una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido en un organismo hospedador adecuado.

En un cuarto aspecto, se proporcionan polinucleótidos (p. ej. aislados y/o purificados) que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica la IPNS variante o los polipéptidos NRPS de los aspectos previos de la invención. Los polinucleótidos de la presente invención incluyen, además, cualesquiera versiones degeneradas de una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido. Por ejemplo, la persona experta, utilizando técnicas rutinarias, puede producir sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia de proteínas codificada en los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso del codón de cualquier organismo hospedador particular en el que se han de expresar los polipéptidos de la invención. Preferiblemente, secuencias codificadoras de los polinucleótidos se optimizan mediante la optimización del par de codones.

La secuencia de polinucleótidos de la invención puede ser ARN o ADN, e incluye ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente, el polinucleótido es una secuencia de ADN.

Los polinucleótidos que codifican los módulos M1, M2 y M3 de la enzima NRPS del primer aspecto pueden tener, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11, que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10, o pueden ser secuencias de nucleótidos que codifican homólogos de las secuencias de aminoácidos antes mencionadas, según se define arriba.

Los polinucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Éstos se pueden producir combinando oligonucleótidos sintetizados de acuerdo con y a lo largo de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de la invención. Alternativamente, se pueden sintetizar sometiendo a mutagénesis un polinucleótido parental en cualquier posición deseada. Los polinucleótidos pueden utilizarse, además, para obtener polinucleótidos que codifican un polipéptido modificado adicional, p. ej. sometiendo los polinucleótidos a técnicas de mutagénesis adicionales.

Así, polipéptidos con una actividad mejorada se obtienen típicamente mediante un método que comprende las etapas de someter a mutagénesis a un polinucleótido que codifica el polipéptido, rastrear la población obtenida de polinucleótidos variantes en cuanto a la actividad deseada y aislar variantes con una actividad mejorada.

5 La mutagénesis se puede hacer utilizando cualquier técnica adecuada conocida por la persona experta en la técnica. La mutagénesis puede abarcar someter a un polinucleótido a mutagénesis aleatoria así como a mutagénesis dirigida al sitio. Cuando se utiliza la mutagénesis dirigida al sitio, ésta se combina preferiblemente con mutagénesis de saturación en la o las posiciones seleccionadas, permitiendo la sustitución del aminoácido original por cualquier otro aminoácido. Se puede utilizar la tecnología del barajeo de polinucleótidos (barajeo de genes) (por ejemplo según se describe en los documentos WO95/22625, WO98/27230, WO98/01581, WO00/46344 y/o WO03/010183) para obtener variantes con una combinación aleatoria de cualquier posición variante presente en cualquier miembro de una población de partida de moléculas. La población de partida puede incluir, además, una o más variantes de acuerdo con la invención.

15 La invención proporciona también vectores que comprenden un polinucleótido de la invención, incluidos vectores o casetes de clonación y expresión.

20 En un vector o casete de expresión, el polinucleótido está operativamente enlazado a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de un polinucleótido a partir de su secuencia codificadora por parte de la célula hospedadora. La expresión, "operativamente enlazado", se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia reguladora tal como un promotor, un potenciador u otra señal reguladora de la expresión "operativamente enlazada" a una secuencia codificadora está situada de manera que la expresión de un polipéptido a partir de su secuencia codificadora se consigue bajo condiciones compatibles con las secuencias reguladoras.

25 Promotores/potenciadores y otras señales reguladoras de la expresión se pueden seleccionar de modo que sean compatibles con la célula hospedadora para la cual está diseñada la casete o el vector de expresión. Si el polipéptido se produce como una proteína secretada, la secuencia de polinucleótidos que codifica una forma madura del polipéptido en la casete de expresión, está operativamente enlazada a una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido señal.

30 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la invención se introduce preferiblemente en un hospedador adecuado como parte de una casete de expresión. Para la transformación del hospedador adecuado con la casete de expresión, están disponibles procesos de transformación que son bien conocidos para la persona experta. La casete de expresión se puede utilizar para la transformación del hospedador como parte de un vector que porta un marcador seleccionable, o la casete de expresión se puede co-transformar como una molécula separada junto con el vector que porta un marcador seleccionable. El vector puede comprender uno o más genes marcadores seleccionables.

40 Para la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras, la construcción de expresión se integra preferiblemente en el genoma de la célula hospedadora con el fin de obtener transformantes estables. En ese caso, las construcciones se integran en loci aleatorios en el genoma o en loci diana predeterminados utilizando la recombinación homóloga.

45 Así, un quinto aspecto de la invención proporciona células hospedadoras transformadas con o que comprenden un polinucleótido o vector de la invención.

Células hospedadoras adecuadas son células hospedadoras que permiten un elevado nivel de expresión de un polipéptido de interés. Células hospedadoras de este tipo se pueden utilizar en el caso de que los polipéptidos necesiten ser producidos y, además, ser utilizados, p. ej., en reacciones *in vitro*. Puede elegirse un hospedador heterólogo en donde el polipéptido de la invención se produce en una forma que está sustancialmente exenta de otros polipéptidos con una actividad similar a la del polipéptido de la invención. Esto se puede conseguir eligiendo un hospedador que no produzca normalmente polipéptidos de este tipo con actividad similar.

55 Células hospedadoras adecuadas son también células capaces de la producción de compuestos de β -lactama, preferiblemente células hospedadoras que poseen la capacidad de producir compuestos de β -lactama en altas concentraciones. Las células hospedadoras pueden ser, por ejemplo, células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas o de levaduras. El hospedador se puede seleccionar en base a la elección para la producción de un compuesto penam o un compuesto cefem. Cuando está prevista la producción de un compuesto cefem, el hospedador puede contener de forma nativa los genes necesarios de la vía biosintética que conduzca a un compuesto cefem, en particular genes que codifican la actividad expandasa y, opcionalmente, la actividad hidroxilasa y acetiltransferasa. Alternativamente, uno o más genes de la vía biosintética que conduce a un compuesto de cefem se pueden transformar en una célula hospedadora desprovista de estos genes. Con ello, es

conocido por la persona experta que las enzimas expandasa y expandasa/hidroxilasa son capaces de expandir ampicilina y amoxicilina (Chin et al. 2003, FEMS Microbiol. Lett., 218, 251-257; Lloyd et al. 2004, J. Biol. Chem. 279, 15420-15426).

5 En una realización, una célula hospedadora adecuada es una célula en donde los genes nativos que codifican las enzimas ACVS y/o IPNS están inactivados, por ejemplo mediante inactivación insercional. También es posible suprimir el racimo biosintético de penicilina completo que comprende los genes que codifican ACVS, IPNS y AT. De esta manera, es posible la producción del compuesto de β -lactama de interés sin la producción simultánea de la β -lactama natural. Con ello, se puede producir una inactivación insercional, utilizando un gen que codifique una NRPS
10 y/o un gen que codifique una IPNS según se describe antes. En células hospedadoras que contienen múltiples copias de racimos de genes de β -lactama, se pueden seleccionar células hospedadoras en donde se han suprimido estos racimos de forma espontánea. Por ejemplo, la delección de racimos de genes de β -lactama se describe en la solicitud de patente PCT/EP2007/054045.

15 Otra célula hospedadora adecuada es una célula que es capaz de sintetizar los aminoácidos precursores Hpg o Pg. La expresión heteróloga de los genes de la vía biosintética que conduce a Hpg o Pg se describe en el documento WO 02/34921. La biosíntesis de Pg o Hpg se consigue separando fenilpiruvato (PP) o *p*-hidroxifenilpiruvato (HPP), respectivamente, de la vía del aminoácido aromático, convirtiendo PP o HPP en ácido mandélico (MA) o ácido *p*-hidroximandélico (HMA), respectivamente, convirtiendo MA o HMA en fenilgloxilato (PGL) o *p*-hidroxifenilgloxilato (HPGL), respectivamente, y finalmente convirtiendo PGL o HPGL en D-Pg o D-Hpg, respectivamente. El Ejemplo 15
20 ilustra la expresión de la vía biosintética de Hpg o Pg en *Penicillium chrysogenum*.

Otra célula hospedadora adecuada es una célula que (sobre)-expresa una 4'-fosfopanteteína transferasa (PPTasa). 4'-fosfopanteteína (PPT) es un grupo prostético esencial entre otras proteínas portadoras de acilo de ácido graso
25 sintasas y policétido sintasas, y proteínas portadoras de peptidilo de NRPSs. El resto tiol libre de PPT sirve para unir covalentemente los compuestos intermedios de la reacción con acilo como tioésteres durante el ensamblaje multietapa de los precursores monoméricos, típicamente grupos acetilo, malonilo y aminoacilo. El resto PPT se deriva de la coenzima A (CoA) y se transfiere post-traducción, sobre una cadena lateral de serina invariante. Esta conversión dependiente de Mg^{2+} de las apoproteínas en las holoproteínas es catalizada por las 4'-fosfopanteteína transferasas (PPTasas). Es ventajoso (sobre)-expresar una PPTasa con una amplia especificidad para el sustrato. Una PPTasa de este tipo es codificada, por ejemplo, por el gen *gsp* procedente de *Bacillus brevis* (Borchert et al. 1994, J. Bacteriology, 176, 2458-2462).
30

Un hospedador puede incluir adecuadamente una o más de las modificaciones según se mencionan arriba. Un
35 hospedador preferido es una cepa de *Penicillium chrysogenum*.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para preparar un polipéptido de acuerdo con la invención, cultivando una célula hospedadora (p. ej. transformada con un vector o casete de expresión según se describe arriba) bajo condiciones que conducen a la expresión (por parte del vector o casete) del polipéptido de
40 acuerdo con la invención, y opcionalmente recuperar el polipéptido expresado. El polipéptido se puede producir en forma de una proteína secretada, en cuyo caso la secuencia de polinucleótidos que codifica una forma madura del polipéptido en la construcción de expresión está operativamente enlazada a una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido señal. El polipéptido también se puede producir como una proteína de fusión, es decir, fusionado a (parte de) otro polipéptido, por ejemplo fusionado a la proteína de unión a maltosa.
45

Para reacciones *in vitro* se puede utilizar un polipéptido secretado o un extracto exento de células que comprende el polipéptido. Opcionalmente, el polipéptido se puede purificar (parcialmente) antes de su uso.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de β -lactama cultivando una célula hospedadora del aspecto previo bajo condiciones para proporcionar la expresión del o de los
50 polipéptidos de IPNS y/o NRPS según se describen en esta memoria y que conduce a la producción de un compuesto de β -lactama y, opcionalmente, recuperar el compuesto de β -lactama. De acuerdo con la invención, el compuesto de β -lactama que se produce es un compuesto de β -lactama N-acilado, en donde la cadena lateral de N-acilo es una cadena lateral de N- α -aminohidroxifenilacetilo o una cadena lateral N- α -aminofenilacetilo. Ventajosamente, la presente invención describe la producción totalmente fermentativa de antibióticos de β -lactama de este tipo. Ejemplos de antibióticos de β -lactama de este tipo son amoxicilina, ampicilina, cefadroxil y cefalexina.
55

Las células hospedadoras de acuerdo con la invención se pueden cultivar utilizando procesos conocidos en la técnica. Para cada una de las combinaciones de un promotor y una célula hospedadora, están disponibles
60 condiciones de cultivo que conducen a la expresión del polipéptido de la invención. Después de alcanzar la densidad celular o título del polipéptido deseado, se detiene el cultivo y el polipéptido se recupera utilizando procesos conocidos. Adicionalmente, se pueden establecer condiciones de fermentación que conduzcan a la

producción de una β -lactama.

El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbono (p. ej. glucosa, maltosa, melaza), una fuente de nitrógeno (p. ej. sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, fuentes de nitrógeno orgánico, p. ej. extracto de levadura, extracto de malta, peptona), vitaminas y otras fuentes nutrientes inorgánicas (p. ej. fosfato, magnesio, potasio, zinc, hierro, elementos traza, etc.). Opcionalmente, se puede incluir un inductor.

La selección del medio apropiado se puede basar en la elección del hospedador de la expresión y/o se puede basar en los requisitos reguladores de la construcción de expresión. Medios de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica. Si se desea, el medio puede contener componentes adicionales que favorezcan a los hospedadores de expresión transformados frente a otros microorganismos potencialmente contaminantes. También puede ser necesario suplementar el medio con compuestos precursores para los compuestos de β -lactama a producir. Por ejemplo, puede ser necesario, dependiendo del hospedador que se utilice, incluir los aminoácidos Hpg o Pg en el medio de cultivo. Si es así, estos aminoácidos se añaden preferiblemente en forma de una alimentación separada.

La fermentación se puede realizar a lo largo de un período de 0,5-30 días. Puede ser un proceso en tandas, continuo o en tandas alimentadas, adecuadamente a una temperatura en el intervalo entre 0 y 45°C y, por ejemplo, a un pH entre 2 y 10. Condiciones de fermentación preferidas son una temperatura en el intervalo entre 20 y 37°C y/o un pH entre 3 y 9. Las condiciones apropiadas se seleccionan habitualmente en base a la elección del hospedador de expresión y de la proteína y/o compuesto de β -lactama a expresar. Después de la fermentación, si es necesario, las células se pueden separar del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Después de haberse detenido la fermentación y/o después de la separación de las células, el polipéptido de la invención o el compuesto de β -lactama producido puede recuperarse utilizando medios convencionales. La recuperación puede incluir etapas de purificación y/o extracción y/o cristalización.

Convenientemente, el polipéptido de la invención o el compuesto de β -lactama se combina con vehículos o diluyentes adecuados (sólidos o líquidos) incluidos tampones para producir una composición de polipéptidos o compuestos de β -lactama. El polipéptido o el compuesto de β -lactama se puede fijar a o mezclar con un vehículo, p. ej. inmovilizar sobre un vehículo sólido. Así, la presente invención proporciona en un aspecto adicional una composición que comprende un polipéptido de la invención o un compuesto de β -lactama. Éste puede estar en una forma adecuada para el envasado, transporte y/o almacenamiento, preferiblemente en los casos en los que se conserva la actividad del polipéptido. Las composiciones pueden ser en forma de pasta, líquido, emulsión, polvo, copos, granulado, gránulo u otra forma de material extrudido.

EJEMPLOS

Materiales y métodos generales

Se llevaron a cabo procesos de ADN convencionales según se describe en otra parte (Sambrook, J. *et al.*, 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), a menos que se establezca de otro modo. Se amplificó ADN utilizando la enzima correctora de errores Phusion polimerasa (Finnzymes). Enzimas de restricción procedían de Invitrogen o New England Biolabs. El crecimiento fúngico se realizó en un medio mineral que contenía (g/L): glucosa (5); lactosa (80); urea (4,5); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,1); Na_2SO_4 (2,9); KH_2PO_4 (5,2); K_2HPO_4 (4,8) y 10 mL/L de una disolución de elementos traza A que contiene ácido cítrico (150); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (15); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (150); H_3BO_3 (0,0075); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,24); $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,375); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,28); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,99); pH antes de la esterilización 6,5. Como medio rico se utilizó YEPD, que contenía (g/L): extracto de levadura (10); peptona (10); glucosa (20). Los cultivos se incubaron a 25°C en un agitador orbital a 280 rpm durante 72-168 h.

Se llevaron a cabo transformaciones de *Penicillium chrysogenum* con la cepa Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089). También son adecuadas otras cepas de *P. chrysogenum*, incluidos mutantes de la cepa Wisconsin 54-1255, que tienen un rendimiento mejorado de β -lactama. Un ejemplo de una cepa de este tipo es CBS 455.95. Además de ello, también son adecuadas cepas de *P. chrysogenum* con mutaciones o deleciones que conducen a la ausencia o a una disminución de la producción de β -lactama en calidad de hospedadores de la transformación, por ejemplo cepas en donde los racimos de genes β -lactama están suprimidos según se describe en la solicitud de patente PCT/EP2007/054045.

La transformación de *P. chrysogenum* se realizó según se describe en el documento WO2004/106347.

Ejemplo 1**Cultivo de *Penicillium chrysogenum* y análisis de tripéptidos no naturales tales como DLD-Hpg-Cys-Val o DLD-Pg-Cys-Val**

5 *Penicillium chrysogenum* se cultivó en medio mineral (25 mL) durante 96 h a 25°C. Opcionalmente, se hicieron crecer cultivos con o sin aminoácidos tales como L-Hpg (concentración final 1 mM) o L-Pg (concentración final 1 mM). Al término de la fermentación, el micelio se retiró mediante centrifugación o filtración, y el micelio se lavó con sal fisiológica. Tanto el micelio como el medio se sometieron a ensayo en cuanto a tripéptidos tales como DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val utilizando técnicas MS tales como LC-MS/MS. Como patrones se utilizaron tripéptidos de DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val sintetizados de forma tradicional. Como resultado, ni en el micelio ni en el medio se identificaron tripéptidos tales como DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val. Como conclusión *P. chrysogenum* no produce estos tripéptidos no naturales.

Ejemplo 2**Clonación del módulo péptido sintetasa no ribosomal y casetes de dominio****2a. Clonación de fragmentos del módulo de NRPS que catalizan la incorporación y subsiguiente epimerización de L-Hpg en D-Hpg**

ADN cromosómico se aisló de *Streptomyces coelicolor* A3(2). Subsiguientemente, se llevaron a cabo reacciones PCR, añadiendo DMSO al 3-8% a las mezclas de reacción, además de ello, empleando condiciones convencionales. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: HpgFw1 (caccatggcgcgactgcccgaactgttc; SEQ ID NO: 12) y HpgRev1 (tcaattaattaaccactc-ggactcaaggtcggac; SEQ ID NO: 13). El fragmento de PCR Hpg1 resultante, proporcionando un tridominio ATE de módulo 6 de CDA I sintetasa de *S. coelicolor*, se clonó en un vector pENTR/SD/D-Topo (Invitrogen, Holanda, dando como resultado el plásmido pHpg1.

2 b. Síntesis a medida de un fragmento de módulo de NRPS sintético que cataliza la incorporación y subsiguiente epimerización de L-Pg en D-Pg.

Se sintetizó a medida un fragmento de ADN sintético que consistía en la secuencia de ADN de acuerdo con SEQ ID NO: 5 (DNA 2.0, Menlo Park, CA, EE.UU.). El fragmento de ADN alberga un tridominio ATE. El fragmento AT procedía del módulo C-terminal de la proteína SnbD de *S. pristinaspiralis* pristinamicina sintetasa, el dominio E se tomó del módulo 6 de la CDA sintetasa de *S. coelicolor*.

El fragmento de ADN se clonó en el vector pCR-Blunt (Invitrogen), utilizando el Protocolo suministrado por el suministrador, proporcionando el vector pPg1.

2 c. Clonación de los fragmentos bi-modulares de NPRS específicos para la incorporación de cisteína y valina

Para este experimento, se tomaron como moldes los genes de ACV (δ (L- α -aminoadipato)-L-cisteína, D-valine) tripéptido sintetasa de *Penicillium chrysogenum* y *Nocardia lactamdurans*. Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR utilizando moldes cromosómicos de ADN de cualquier organismo. Para *P. chrysogenum*, se emplearon los siguientes oligonucleótidos: el par oligo PcM2M3fw1 (caccttaattaatgaggagaatgcagcaaccggac; SEQ ID NO: 14) y PcM2M3rev1 (tcaatagcgcgaggtgttc; SEQ ID NO: 15), dando como resultado el fragmento PcM2M3_1 (organización del dominio CATCATETe), el par oligo PcM2M3fw2 (caccactagtctggagtatctctcatctac; SEQ ID NO: 16) y PcM2M3rev1 (tcaatagcgcgaggtgttc; SEQ ID NO: 15), dando como resultado el fragmento PcM2M3_2 (organización del dominio ATCATETe). El fragmento PcM2M3_1 se clonó en pENTR/SD/D-Topo, proporcionando pPcM2M3_1, y clonando el fragmento PcM2M3_2 en el mismo vector dieron el plásmido pPcM2M3_2. De una manera análoga, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR con ADN cromosómico de *Nocardia lactamdurans*. Reacciones utilizando los oligonucleótidos NIM2M3fw1 (caccttaattaatgcccgaagaggtcaccacc; SEQ ID NO: 17) y NIM2M3rev1 (ggctcatcgctccctagg; SEQ ID NO: 18) dieron el fragmento de ADN NIM2M3_1 (organización del dominio CATCATETe), mientras que reacciones con los oligos NIM2M3fw2 (caccactagtctcatctcaccgtcgatg; SEQ ID NO: 19) y NIM2M3rev1 (ggctcatcgctccctagg; SEQ ID NO: 18) dieron como resultado el fragmento NIM2M3_2 (organización del dominio ATCATETe). Ambos fragmentos se clonaron finalmente en vectores pENTR/SD/D-Topo, proporcionando los plásmidos pNIM2M3_1 y pNIM2M3_2, respectivamente.

2 d. Clonación del fragmento del dominio de condensación de NRPS específico para la formación del enlace peptídico entre un D- y un L-aminoácido

Se clonaron dos dominios de condensación diferentes con estereoquímica D_{CL} . El primer dominio se amplificó mediante PCR a partir de CDAI sintetasa utilizando ADN cromosómico de *Streptomyces coelicolor*, empleando los oligo-nucleótidos *sc_C_fw* (caccttaattaatagccagcaaccgaccgtgcg; SEQ ID NO: 20) y *sc_C-rev* (ttactagtgtcggggcgtacgcctcgtc; SEQ ID NO: 21), proporcionando el fragmento *sc_C*. El segundo fragmento, que consistía en el dominio C de D_{CL} de NRPS procedente del módulo C2 de la iturina sintetasa *ItuC* de *B. subtilis* de acuerdo con SEQ ID NO: 22, se sintetizó a medida y se denominó *Bs_C*. Ambos fragmentos se clonaron en el vector pENTR/SD/D-Topo, dando como resultado los plásmidos pSC_C y pBS_C, respectivamente.

Ejemplo 3

Construcción de genes del tripéptido de peptide sintetasa no ribosomal mediante fusión del módulo de NRPS clonado y casetes del dominio

El plásmido pHpg1 se digirió con las enzimas de restricción Pacl y Ascl, dando como resultado un fragmento de ADN de 5,9 kb que contiene el gen del módulo de NRPS específico para Hpg y la mayor parte de la secuencia del vector. El plásmido pPcM1M2_1 se cortó con Ascl y Pacl, mostrando un fragmento de ADN de 8,5 kb. El ligamiento de este fragmento y el fragmento de 5,9 kb procedente de pHpg1 dio el vector pSCPCHíbrido1. Los plásmidos pPcM1M2_2, pSC_C se restringieron con Spel y Ascl, dando como resultado fragmentos de 7,0 kb y 1,4 kb, respectivamente. Ambos fragmentos se ligaron y dieron el plásmido pPcM1M2_3. El plásmido pPcM1M2_3 y el plásmido pHpg1 se cortaron con Pcil y Pacl, dando fragmentos de ADN de 12 kb y 4,5 kb, respectivamente. El ligamiento de los dos fragmentos dio como resultado la construcción final pSCSC_C_PCM2M3Hybrid1. Una restricción adicional de pSC_SC_C_PCM2M3Hybrid1 y pBS_C con Pacl y Spel condujo a fragmentos de 16 kb (pSC_SC_C_PCM2M3Hybrid1 sin el dominio C del módulo 2 de ACV sintetasa) y 1,4 kb (dominio C de *Bacillus subtilis*), respectivamente. El ligamiento de los dos fragmentos dio el plásmido pSC_BS_C_PCM2M3Hybrid2.

La restricción de pHpg1 y pNIM1M2_1 con Pacl y AflII dio fragmentos de ADN de 3,7 kb y 8,8 kb. El ligamiento de ambos fragmentos proporcionó el plásmido pSCNLHíbrido1. Los plásmidos pSC_SC_C_PCM2M3Hybrid1 y pNIM1M2_2 se restringieron con Spel y AflII, dando como resultado una organización de tetradominio de 4 kb (organización de tetradominio ATEC del módulo Hpg y el dominio (D)C(L)) y fragmentos de 7 kb (organización ATCATETe), respectivamente. El ligamiento de los dos fragmentos dio el plásmido pSC_SC_C_NLM2M3Hybrid1. Por analogía, los plásmidos pSC_BS_C_PCM2M3Hybrid1 y pNIM1M2_2 se restringieron con Spel y AflII, dando como resultado fragmentos de 4 kb (organización de tetradominio ATEC procedente del módulo Hpg y el dominio (D)C(L)) y 7 kb (organización ATCATETe), respectivamente. El ligamiento proporcionó el plásmido pSC_BS_C_NLM2M3Hybrid2.

Para la construcción de un gen de fusión de péptido sintetasa no ribosomal específico para fenilglicina, los plásmidos pPg1 y pSC_SC_C_NLM2M3Híbrido1 se restringieron cada uno con las enzimas de restricción AflII y Pacl. El fragmento de ADN de 3,4 kb que alberga el tridominio ATE NRPS) de pPg1 se ligó en los fragmentos de vector de 14 kb obtenidos mediante restricción de pSC_SC_C_NLM2M3Hybrid1, dando como resultado el plásmido pPg_SC_C_NIM2M3Hybrid1. Por analogía, si el vector pSC_SC_C_NLM2M3Hybrid1 se reemplazó por el vector pSC_BS_C_NLM2M3Hybrid2, el plásmido resultante era pPg_BS_C_NIM2M3Hybrid2.

Ejemplo 4

Construcción de un vector de destino de la expresión Gateway® de *Penicillium chrysogenum* para péptido sintetasa no ribosomales híbridas

El plásmido pPT12, que alberga la casete promotor-terminador, flanqueada por NotI, procedente de IPN sintasa de *Penicillium chrysogenum* fue digerido con NotI (para la descripción del vector, véase Theilgaard et al. 2000, *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 380-387). La casete de promotor-terminador de IPNS, así obtenida, se clonó en pBluescriptII SK (Stratagene, Holanda), que también fue tratado con NotI. El ligamiento condujo a pProduct1. El plásmido pProduct1 se restringió con BamHI y XhoI. Adicionalmente, se sintetizó a medida un fragmento de ADN que alberga una casete de resistencia a fleomicina bajo el control de un promotor *gpdA*. La casete tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 23.

Después de la restricción de este fragmento de ADN sintetizado a medida con BamHI y XhoI, el ADN resultante se ligó en el vector pProduct1 (que se abrió con BamHI, XhoI). El plásmido resultante se denominó pProduct2. En una etapa de clonación final, un fragmento de ADN que contiene una casete attR1-cat-ccdB-attR2 (resistencia a cloranfenicol y un gen de toxicidad para *E. coli*) se amplificó mediante PCR a partir de un vector de destino Gateway® tal como pET-DEST42 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: dir: ttatcgattgcataaaaaacagac (SEQ ID NO: 24), inv: ttatcgatgcttacctcaagctcg (SEQ ID NO: 25). El fragmento de ADN resultante se restringió con ClaI y subsiguientemente se clonó en pProduct2 que fue previamente abierto

asimismo mediante digestión con ClaI. Aquí, se rastrearon plásmidos que albergaban el fragmento attR1-cat-ccdB-attR2 en una orientación tal que attR1 se fusiona a continuación del promotor P_{IPNS} de IPNS. El vector de destino Gateway[®] resultante se denominó pDEST-Pcexpr1.

5 **Ejemplo 5**

Construcción de construcciones de expresión de *P. chrysogenum* para péptido sintetasas no ribosomales

Para la construcción de construcciones de expresión de *P. chrysogenum*, se llevó a cabo una reacción de LR-clonasa Gateway[®] utilizando condiciones convencionales según se describe por Invitrogen. Para protocolos detallados, véanse los manuales para la tecnología Gateway[®] en <http://www.invitrogen.com>. Para la reacción, cada uno de los vectores de entrada pSCNLHybrid1, pSC_SC_C_NLM2M3Hybrid1 y pSC-BS_C_NLM2M3Hybrid2 se incubaron con el vector de destino Gateway[®] pDEST-Pcexpr1. Véase la Tabla 1 para los nombres de plásmido de expresión resultantes.

Alternativamente, para la construcción de construcciones de expresión de *P. chrysogenum*, las construcciones que contenían los genes NRPS de tripéptidos tratados mediante ingeniería se enlazaron funcionalmente a la casete de promotor-terminador flanqueada por NotI procedente del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* (para la descripción del vector, véase Theilgaard et al. 2000, *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 380-387) mediante PCR de fusión. Véase la Tabla 1 para los nombres de plásmidos de expresión resultantes.

Tabla 1

Vector de ENTRADA utilizado en la Reacción LR	Vector de expresión resultante
pSCNLHybrid1	pEXPR-NRPS4
pSC_SC_C_NLM2M3Hybrid1	pEXPR-NRPS5
pSC_BS_C_NLM2M3Hybrid2	pEXPR-NRPS6
pPG_SC_C_NIM2M3Hybrid1	pEXPR-NRPS7
pPG_BS_C_NIM2M3Hybrid2	pEXPR-NRPS8

25 **Ejemplo 6**

Transformación de *Penicillium chrysogenum* con el plásmido pEXPR-NRPS4 linearizado, cultivo y análisis de tripéptidos

En experimentos independientes, *Penicillium chrysogenum* se transformó con pEXPR-NRPS4 que se linearizó antes de la transformación con enzimas adecuadas que cortan en la cadena principal del vector, tal como P_{sil} o P_{cil}. La selección de transformante se realizó en placas de agar con medio mineral con 50 g/mL de fleomicina y sacarosa 1 M. Colonias resistentes a fleomicina que aparecen en estas placas de regeneración de protoplastos se volvieron a sembrar sobre placas de agar de fleomicina recientes sin la sacarosa y se hicieron crecer hasta la esporulación. Los transformantes resistentes a fleomicina se rastrearon a través de la PCR de la colonia en cuanto a la presencia de genes NRPS. Para ello un pequeño trozo de colonia se suspendió en 50 L de tampón TE (Sambrook et al., 1989) y se incubó durante 10 min a 95°C. Para desechar los residuos de células, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante (5 L) se utilizó como un molde para la reacción PCR con Super-Taq procedente de HT Biotechnology Ltd. Las reacciones PCR se analizaron en el E-gel96 de Invitrogen.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en el rastreo por PCR de la colonia (véase SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27):

Plásmido transformado: pEXPR-NRPS4
Oligo-nucleótidos para la PCR de la colonia: Dir: GCCTGGTGCCTGATGC
 Inv.: GGTGTGGTCGGAGACG

El tamaño esperado de estas reacciones PCR era 303 pb.

Los clones positivos fueron sometidos a una etapa de purificación adicional en placas de agar de fleomicina recientes sin la sacarosa. Subsiguientemente, se hicieron crecer en medio mineral según se describe en "Materiales y Métodos Generales". Adicionalmente, el aminoácido L-Hpg (4-hidroxifenilglicina) o L-Pg (fenilglicina) se añadió a una concentración final de 1 mM, dependiendo de qué tripéptido se analizara. El cultivo se llevó a cabo a escala de matraces agitadores o en placas de microtitulación de 24 pocillos. Al término de la fermentación, el micelio se separó mediante centrifugación o filtración, y el micelio se lavó con sal fisiológica. Tanto el micelio como el medio se sometieron a ensayo en cuanto a tripéptidos tales como DLD-Hpg-Cys-Val (en el caso de que L-Hpg se añadiera al

medio) y DLD-Pg-Cys-Val (en el caso de que L-Pg se añadiera al medio) utilizando técnicas MS tales como LC-MS/MS. Como patrones se utilizaron tripéptidos de DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val sintetizados a medida. Como resultado, ni en el micelio ni en el medio se identificaron tripéptidos tales como los tripéptidos de DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val. Como conclusión, *P. chrysogenum*, no produce estos tripéptidos no naturales si se integraron construcciones de casetes de expresión de NRPS tales como pEXPR-NRPS4.

Ejemplo 7

Transformación de *Penicillium chrysogenum* con los plásmidos pEXPR-NRPS5 y pEXPR-NRPS6 linealizados, cultivo y producción del tripéptido DLD-Hpg-Cys-Val

En experimentos independientes, *Penicillium chrysogenum* se transformó con pEXPR-NRPS5 o pEXPR-NRPS6 que se linealizaron antes de la transformación con enzimas adecuadas que cortan en la cadena principal del vector, tal como Psil o Pcil. La transformación de *P. chrysogenum* se llevó a cabo bajo condiciones descritas, p. ej. en el documento WO2004/106347. La selección de transformantes se realizó en placas de agar con medio mineral con 50 g/mL de fleomicina y sacarosa 1 M. Colonias resistentes a fleomicina que aparecen en estas placas de regeneración de protoplastos se volvieron a sembrar sobre placas de agar de fleomicina recientes sin la sacarosa y se hicieron crecer hasta la esporulación. Los transformantes resistentes a fleomicina se rastrearon a través de la PCR de la colonia en cuanto a la presencia de genes NRPS. Para ello un pequeño trozo de colonia se suspendió en 50 L de tampón TE (Sambrook et al., 1989) y se incubó durante 10 min a 95°C. Para desechar los residuos de células, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante (5 L) se utilizó como un molde para la reacción PCR con Super-Taq procedente de HT Biotechnology Ltd. Las reacciones PCR se analizaron en el E-gel96 de Invitrogen.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en el rastreo por PCR de la colonia (véase SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27):

Plásmido transformado: pEXPR-NRPS5 o pEXPR-NRPS6
Oligo-nucleótidos para la PCR de la colonia: Dir: GCCTGGTGCCTGATGC
 Inv.: GGTGTGGTCGGAGACG

El tamaño esperado de estas reacciones PCR era 303 pb.

Los clones positivos fueron sometidos a una etapa de purificación adicional en placas de agar de fleomicina recientes sin la sacarosa. Subsiguientemente, se hicieron crecer en medio mineral según se describe en "Materiales y Métodos Generales". Adicionalmente, el aminoácido L-Hpg (4-hidroxifenilglicina) o L-Pg (fenilglicina) se añadió a una concentración final de 1 mM, dependiendo de qué tripéptido se analizara. El cultivo se llevó a cabo a escala de matraces agitadores o en placas de microtitulación de 24 pocillos. Al término de la fermentación, el micelio se separó mediante centrifugación o filtración, y el micelio se lavó con sal fisiológica. Tanto el micelio como el medio se sometieron a ensayo en cuanto a tripéptidos tales como DLD-Hpg-Cys-Val (en el caso de que L-Hpg se añadiera al medio) y DLD-Pg-Cys-Val (en el caso de que L-Pg se añadiera al medio) utilizando técnicas MS tales como LC-MS/MS. Como patrones se utilizaron tripéptidos de DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val sintetizados a medida. El micelio y el sobrenadante mostraron niveles significativos del tripéptido DLD-Hpg-Cys-Val. El control negativo, para el que se empleó una cepa de *P. chrysogenum* no transformada Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089) no mostró formación del tripéptido DLD-Hpg-Cys-Val. Este resultado proporciona una prueba de que las péptidos sintetizadas no ribosomales tratadas mediante ingeniería transformadas producen el tripéptido no natural DLD-Hpg-Cys-Val.

Ejemplo 8

Transformación de *Penicillium chrysogenum* con los plásmidos pEXPR-NRPS7 y pEXPR-NRPS8 linealizados, cultivo y producción del tripéptido DLD-Pg-Cys-Val

En experimentos independientes, *Penicillium chrysogenum* se transformó con pEXPR-NRPS7 o pEXPR-NRPS8 que se linealizaron antes de la transformación con enzimas adecuadas que cortan en la cadena principal del vector, tal como Psil o Pcil. La transformación de *P. chrysogenum* se llevó a cabo bajo condiciones descritas, p. ej. en el documento WO2004/106347. La selección de transformantes se realizó en placas de agar con medio mineral con 50 g/mL de fleomicina y sacarosa 1 M. Colonias resistentes a fleomicina que aparecen en estas placas de regeneración de protoplastos se volvieron a sembrar sobre placas de agar de fleomicina recientes sin la sacarosa y se hicieron crecer hasta la esporulación. Los transformantes resistentes a fleomicina se rastrearon a través de la PCR de la colonia en cuanto a la presencia de genes NRPS. Para ello un pequeño trozo de colonia se suspendió en 50 L de tampón TE (Sambrook et al., 1989) y se incubó durante 10 min a 95°C. Para desechar los residuos de células, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante (5 L) se utilizó como un molde para la

reacción PCR con Super-Taq procedente de HT Biotechnology Ltd. Las reacciones PCR se analizaron en el E-gel96 de Invitrogen.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en el rastreo por PCR de la colonia (véase SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27):

Plásmido transformado: pEXPR-NRPS7 o pEXPR-NRPS8
Oligo-nucleótidos para la PCR de la colonia: Dir: GCCTGGTGCCTGATGC
 Inv.: GGTGTGGTCCGAGACG

El tamaño esperado de estas reacciones PCR era 303 pb.

Los clones positivos fueron sometidos a una etapa de purificación adicional en placas de agar de fleomicina recientes sin la sacarosa. Subsiguientemente, se hicieron crecer en medio mineral según se describe en "Materiales y Métodos Generales". Adicionalmente, el aminoácido L-Hpg (4-hidroxifenilglicina) o L-Pg (fenilglicina) se añadió a una concentración final de 1 mM, dependiendo de qué tripéptido se analizara. El cultivo se llevó a cabo a escala de matraces agitadores o en placas de microtitulación de 24 pocillos. Al término de la fermentación, el micelio se separó mediante centrifugación o filtración, y el micelio se lavó con sal fisiológica. Tanto el micelio como el medio se sometieron a ensayo en cuanto a tripéptidos tales como DLD-Pg-Cys-Val (en el caso de que L-Pg se añadiera al medio) utilizando técnicas MS tales como LC-MS/MS. Como patrones se utilizaron tripéptidos de DLD-Hpg-Cys-Val y DLD-Pg-Cys-Val sintetizados a medida. El micelio y el sobrenadante mostraron niveles significativos del tripéptido DLD-Pg-Cys-Val. El control negativo, para el que se empleó una cepa de *P. chrysogenum* no transformada Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089) no mostró formación del tripéptido DLD-Pg-Cys-Val. Este resultado proporciona una prueba de que las péptido sintetasas no ribosomales tratadas mediante ingeniería transformadas producen el tripéptido no natural DLD-Pg-Cys-Val.

Ejemplo 9

Producción in vitro de amoxicilina mediante conversión de DLD-HpgCV

Tres construcciones diferentes que contenían los genes *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* (pAJL-*pcbC*), *Nocardia lactamdurans* (pAJL-*pcbC*-NL) y *Aspergillus nidulans* (pXTN313) se inocularon a partir de un material de glicerol y se hicieron crecer durante una noche a 37°C en 2xTY y 35 µg de cloranfenicol por ml. Los genes *pcbC* respectivos codifican IPNSs que están siendo producidas como proteínas de fusión con MBP (proteína de unión a maltosa), codificadas por el gen *malE* de *Escherichia coli*. Los genes de fusión *malE-pcbC* están bajo el control del promotor *tac* inducible por IPTG.

ADN del plásmido se aisló de los cultivos de una noche. El ADN aislado se utilizó para transformar TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). Se utilizó una colonia aislada para inocular 10 ml de 2xTY suplementado con 35 µg de cloranfenicol por ml. Después de incubación durante una noche a 37°C y 280 rpm, se midió la DO⁶⁰⁰. Las cepas se diluyeron hasta 100 ml de medio reciente hasta una DO⁶⁰⁰ final de 0,015. Se permitió el crecimiento a 37°C y 280 rpm hasta que la DO⁶⁰⁰ alcanzó un valor entre 0,4 y 0,6. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM. La incubación se continuó a 22°C y 220 rpm durante una noche.

Las células se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron con NaCl al 0,9% en agua milliQ. Los sedimentos de células se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de extracción (Tris.HCl 50 mM, pH 7,5; 0,5 mg de lisozima/ml, DTT 5 mM). Se realizó un tratamiento con ultrasonidos con el fin de lisar las células. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 14000 rpm en una centrífuga Eppendorf, se recogieron partes alícuotas de 200 µl y se congelaron en nitrógeno líquido. Los extractos exentos de células congelados se almacenaron a -80°C.

Se realizaron ensayos de la actividad de IPNS con ACV y HpgCV como sustratos. Aparte de las condiciones convencionales del ensayo para el ensayo de la actividad de IPNS, se aplicaron modificaciones a la mezcla de ensayo con el fin de maximizar la probabilidad de éxito.

Las mezclas de reacción eran como sigue:

Mezcla de reacción 1 (ensayo estándar)

Tris.HCl 30 – 50 mM pH 8,0 (preferiblemente 36 mM)
 ascorbato 1 – 6,7 mM (preferiblemente 3 mM),
 FeSO₄ 50 µM a 2 mM (preferiblemente 86 µM)
 tripéptidos 0,3 – 2 mM (preferiblemente 1,5 mM para ACV y 0,75 mM para HpgCV)

DTT 0,75 – 4 mM (preferiblemente 3 mM)

La bis-ACV se redujo a ACV mezclando dos partes alícuotas de bis-ACV 7,5 mM con una parte alícuota de DTT 60 mM, seguido de incubación durante 5 a 25 minutos a la temperatura ambiente. Igualmente, HpgCV se redujo antes del ensayo real.

Mezcla de reacción 2 (ensayo estándar)

HEPES 30 – 50 mM pH 7,0 (preferiblemente 36 mM)
 ascorbato 0,1 – 0,2 mM (preferiblemente 0,1 mM),
 FeSO₄ 1 - 50 μM (preferiblemente 25 μM)
 tripéptidos 0,3 – 2 mM (preferiblemente 1,5 mM para ACV y 0,75 mM para HpgCV)
 TCEP 0,2 – 1,2 mM (Tris(2-carboxietil)fosfina) (preferiblemente 3 mM)

Bis-ACV y HpgCV se pre-trataron con TCEP con el fin de romper los enlaces S-S en los dímeros. Para este fin, dos partes alícuotas de bis-ACV o HpgCV 7,5 mM se mezclaron con una parte alícuota de TCEP 20 mM, seguido de incubación durante 5 a 25 minutos a la temperatura ambiente.

5 μl de los CFEs que contienen las proteínas de fusión MBP-IPNS se incubaron con 595 μl de las mezclas de reacción arriba mencionadas. Después de 10 minutos de incubación a 25°C, la reacción se detuvo añadiendo 125 μl de la reacción con 50 μl de metanol enfriado con hielo. Después de la incubación a -20°C durante al menos una hora, las muestras se analizaron mediante LC/MS.

El análisis de LC/MS se realizó en un LCQ (Thermo Scientific), utilizando los siguientes ajustes:

Eluyentes	Eluyente A: FA al 0,1% en agua MilliQ Eluyente B: FA al 0,1% en agua MilliQ
Gradiente	T(min) caudal (ml/min) %A %B
	0,0 0,2 98 2
	5,0 0,2 98 2
	20,0 0,2 78 22
	20,1 0,2 98 2
	30,0 0,2 98 2
Columna	Varian Inertsil 3 ODS 3 CP22568 150*2,1 mm 3 μm
Temp. de la columna	55°C
Caudal	0,2 ml/min
Volumen de inyección	25 μl
Temp.. de la bandeja	4°C
Tiempo de retención:	
IPN	Aprox. 12,2 min
Amoxicilina	Aprox. 4,9 min
Ampicilina	Aprox. 16,5 min
MS	
Instrumento	LCQ (SM05)
LC/MS	eje OFF ESI/pos Sonda altura nº 6, profundidad nº 3
LC/MS/MS	360 iw = 5,0 aa = 30%
	366 iw = 5,0 aa = 30%
	350 iw = 5,0 aa = 30%
LC/MS/MS/MS	349 iw = 5,0 aa = 30%
intervalo m/z	MS: 200 – 1000
micro-barridos	1
tiempo de inyección	500 ms

Las muestras se diluyeron 10 veces con agua milliQ y se inyectaron 25 μl en el sistema LC/MS.

Se identificaron sustratos (ACV, HPgCV, PgCV) y productos (IPN, amoxicilina, ampicilina) en base al tiempo de retención (LC), el valor (MS) de la masa frente a la carga (m/z), así como el modelo de fragmentación tras la

fragmentación en el modo MSⁿ.

Los resultados se resumen en la tabla que figura a continuación.

- 5 Tabla 2: Conversión de los sustratos ACV y HpgCV en IPN y amoxicilina, respectivamente, mediante las proteínas de fusión MBP-IPNS de diferentes fuentes

Gen pcbC de origen	ACV → IPN		HpgCV → amoxicilina	
	Mezcla de reacción 1	Mezcla de reacción 2	Mezcla de reacción 1	Mezcla de reacción 2
<i>P. chrysogenum</i>	16%	50%	0%	0,0006%
<i>A. nidulans</i>	36%	98%	0%	0,0007%
<i>N. lactamdurans</i>	36%	99%	0%	0,0006%

- 10 Sorprendentemente, bajo las condiciones experimentales de la mezcla de reacción 2, MBP-IPNS es capaz de convertir HpgCV en amoxicilina, mientras que no se convierte amoxicilina alguna bajo las condiciones de la mezcla de reacción 1.

Ejemplo 10

- 15 **Desarrollo de un bioensayo que permite la detección de la conversión de DLD-HpgCV en amoxicilina**

Las cepas bacterianas *Escherichia coli* ESS, *Bacillus subtilis* ATCC6633 y *Micrococcus luteus* ATCC9341 se hicieron crecer durante una noche en medio 2xTY a 30°C y 280 rpm. Después de 16 horas de crecimiento, se midió la DO⁶⁰⁰. Típicamente, la D⁶⁰⁰ asciende a 5,0, oscilando entre 2,0 y 8,0.

- 20 Se preparó una disolución de amoxicilina a una concentración de 7 mg/ml. Subsiguientemente, se realizaron diluciones en serie que oscilaban entre 1 mg/l y 0,001 mg/l. Agua milliQ servía como un control negativo.

- 25 En una microplaca de 96 pocillos, 25 µl de las diluciones en serie se pipetearon en los pocillos. Cada una de las microplacas se preparó por duplicado. Los cultivos bacterianos durante una noche se diluyeron en medio 2xTY reciente hasta una DO⁶⁰⁰ final de 0,01. A cada uno de los pocillos se añadieron 150 µl de los cultivos bacterianos diluidos. Las microplacas se cubrieron con una tapa y se incubaron durante una noche a 25°C y la microplaca duplicada a 37°C.

- 30 Después de 16 horas de incubación, la DO⁶⁰⁰ se leyó en un lector de microplacas. A partir de los resultados, la concentración de amoxicilina seguía permitiendo leer el crecimiento no inhibido de los microorganismos de ensayo.

Tabla 3: Concentración de amoxicilina que todavía permite el crecimiento no inhibido en medio 2xTY

Cepa	[Amoxicilina] (mg/l) a 25°C	[Amoxicilina] (mg/l) a 37°C
<i>Escherichia coli</i> ESS (DS10031)	0,1	0,1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	1,0	5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0,001	0,002

- 35 **Ejemplo 11**

Desarrollo de un bioensayo que permite la detección de la conversión de DLD-PgCV en ampilina

- 40 Las cepas bacterianas *Escherichia coli* ESS, *Bacillus subtilis* ATCC6633 y *Micrococcus luteus* ATCC9341 se hicieron crecer durante una noche en medio 2xTY a 30°C y 280 rpm. Después de 16 horas de crecimiento, se midió la DO⁶⁰⁰. Típicamente, la D⁶⁰⁰ asciende a 5,0, oscilando entre 2,0 y 8,0.

- 45 Se preparó una disolución de ampilina a una concentración de 7 mg/ml. Subsiguientemente, se realizaron diluciones en serie que oscilaban entre 1 mg/l y 0,001 mg/l. Agua milliQ servía como un control negativo.

- 50 En una microplaca de 96 pocillos, 25 µl de las diluciones en serie se pipetearon en los pocillos. Cada una de las microplacas se preparó por duplicado. Los cultivos bacterianos durante una noche se diluyeron en medio 2xTY reciente hasta una DO⁶⁰⁰ final de 0,01. A cada uno de los pocillos se añadieron 150 µl de los cultivos bacterianos diluidos. Las microplacas se cubrieron con un sello adhesivo permeable al gas y se incubaron durante una noche a 25°C y la microplaca duplicada a 37°C.

Después de 16 horas de incubación, la DO⁶⁰⁰ se leyó en un lector de microplacas. A partir de los resultados, la concentración de amoxicilina seguía permitiendo leer el crecimiento no inhibido de los microorganismos de ensayo.

Tabla 4: Concentración de ampicilina que todavía permite el crecimiento no inhibido en medio 2xTY

5

Cepa	[Ampicilina] (mg/l) a 25°C	[Ampicilina] (mg/l) a 37°C
<i>Escherichia coli</i> ESS (DS10031)	0,05	0,05
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0,5	2,5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0,001	0,002

Ejemplo 12

Rastreo de genes *pcbC* procedentes de diferentes géneros para la conversión in vitro de DLD-HpgCV en amoxicilina

10

Las regiones codificadoras de genes *pcbC* procedentes de 11 especies fueron ordenadas en DNA 2.0 (1430 O'Brien, Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, EE.UU.). Para este fin, la secuencia de ADN de la región codificadora se tomó como base. Se seleccionaron las siguientes especies: *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus (Emericella) nidulans*, *Streptomyces jumonjinensis*, *Nocardia lactamdurans*, *Streptomyces microflavis*, *Lysobacter lactamgenus*, *Flavobacterium species*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces cattleya*.

15

La secuencia del codón de inicio se cambió a CATATG, el sitio de reconocimiento de *NdeI*, con el fin de facilitar las futuras etapas de clonación. De igual manera, un sitio *NsiI* (ATGCAT) se introdujo inmediatamente detrás del codón de terminación. Sitios *NsiI* y *NdeI* internos se separaron lo más posible.

20

Los plásmidos que portan los genes *pcbC* se cortaron con *NsiI* y *NdeI*, y la región codificadora del gen *pcbC* se aisló y subclonó en el vector pSJ127 que se cortó con las mismas enzimas. De esta manera, la región codificadora del gen *pcbC* se clona en marco con el gen *malE* que codifica la proteína de unión a maltosa, bajo el control de un promotor inducible. Tras la inducción de la expresión, se sintetizará una proteína de fusión que consistirá en la proteína de unión a maltosa en el extremo N de la proteína de fusión e IPNS en el extremo C.

25

TOP10 de *E. coli*, transformado con los plásmidos *malE-pcbC*, se hizo crecer en medio 2xTY que contenía 35 µg de cloranfenicol/ml durante una noche a 37°C y 280 rpm. Al día siguiente, se midió la DO⁶⁰⁰ y las células se diluyeron en medio reciente hasta una DO⁶⁰⁰ final de 0,015. Las células se hicieron crecer adicionalmente (37°C, 280 rpm) hasta que la DO⁶⁰⁰ alcanzó un valor de 0,4 – 0,6. IPTG se añadió hasta una concentración final de 0,5 mM. El crecimiento prosiguió a 22°C, 280 rpm durante una noche. Las células se recolectaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm y 4°C. Las células se lavaron con disolución de NaCl al 0,9% y se sedimentaron de nuevo mediante centrifugación. Los sedimentos de células se congelaron a -20°C durante al menos 16 horas.

35

Sedimentos de células se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de extracción (Tris.HCl 50 mM, pH 7,5; DTT 5 mM) y los extractos se realizaron mediante tratamiento con ultrasonidos. Los extractos se centrifugaron con el fin de separar el desecho celular en una centrífuga Eppendorf (10 minutos, 14000 rpm, 4°C). El sobrenadante (extracto exento de células, CFE) se repartió en partes alícuotas en tubos Eppendorf recientes y se congeló en nitrógeno líquido y subsiguientemente se almacenó a -80°C.

40

La conversión de HpgCV en amoxicilina se sometió a ensayo como sigue. Primeramente, el sustrato HpgCV se redujo mezclando 500 µl de HpgCV 200 mM y 500 µl de TCEP 20 mM, seguido de incubación a 25°C durante 10 minutos. En segundo lugar, se preparó la siguiente mezcla de ensayo (para 10 reacciones): 300 µl de FeSO₄·7H₂O 0,5 mM; 480 µl de ascobato 1,25 mM; 4270 µl de HEPES 50 mM (pH 7,0). El ensayo se inició mezclando 90 µl de sustrato reducido, 505 µl de mezcla de ensayo y 5 µl del CFE, que contenía la proteína de fusión MBP-IPNS.

45

La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 10 minutos.

50

25 µl de la mezcla de reacción se mezclaron con 150 µl de un cultivo de una noche diluido de *Micrococcus luteus* en 2xTY (DO⁶⁰⁰ = 0,01) en una microplaca. Con el fin de verificar que cualquier posible inhibición del crecimiento fue causada por la formación de amoxicilina, cada una de las muestras también se sometió a ensayo en presencia de β-lactamasa (Penase[®] de BBL Difco), que escinde el anillo de β-lactama y, con ello, inactiva la actividad antibiótica.

55

La microplaca se cubrió con una tapa y se incubó durante una noche a 30°C y 550 rpm. La DO⁶⁰⁰ se leyó en un lector de microplacas.

Sorprendentemente, las proteínas de fusión MBP-IPNS que proceden de los genes *pcbC* de *A. nidulans* así como de *S. clavuligerus* mostraron ambas una inhibición del crecimiento de *M. luteus*, el cual crecía por completo en presencia de Penase[®], indicando que la inhibición era debida a la formación de amoxicilina procedente de DLD-HpgCV.

5 Esto se confirmó mediante análisis LC-MS/MS. Para este fin, la reacción se detuvo añadiendo 125 μ l de mezcla de reacción con 50 μ l de metanol (-20°C). Las muestras se incubaron durante al menos 1 hora a -20°C. Se realizó una etapa de centrifugación (14000 rpm durante 15 minutos a 4°C), seguido de análisis LC-MS/MS (véase el Ejemplo 9). Los resultados confirmaron los resultados del bioensayo.

10 Como control se incluyó LLD-ACV. De hecho, como era de esperar, casi todas las proteínas de fusión MBP-IPNS formaban IPN (isopenicilina N). La adición de Penase[®] a la mezcla de reacción suprimió el efecto observado. De nuevo, los resultados fueron confirmados mediante LC-MS/MS.

15 **Ejemplo 13**

Tratamiento mediante ingeniería genética de genes *pcbC*

20 Los clones pSJ-AnIPNS (gen *pcbC* de *A. nidulans*) y pSJ-ScIPNS (gen *pcbC* de *S. clavuligerus*) se sometieron a PCR propensa a error (EP-PCR), utilizando el kit Diversify PCR de Clontech de acuerdo con las directrices del suministrador. En síntesis, el número de errores introducidos por la PCR se puede modificar aplicando diferentes condiciones de la PCR.

25 Los insertos *pcbC* amplificados se subclonaron en el vector de expresión pBADMHmalEDEST, utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *NsiI*. También en este plásmido, IPNS será producida como una proteína de fusión MBP.

30 De cada una de las condiciones aplicadas se secuenciaron 10 clones. Los bancos en los que se encontró una tasa de mutación de aproximadamente 1 mutación por kb, se seleccionaron para el rastreo de variantes mejoradas con respecto a la conversión de HpgCV en amoxicilina.

35 Los bancos de *pcbC* de *A. nidulans* y *S. clavuligerus* seleccionados se hicieron crecer y el inserto se subclonó en el vector de expresión pBADMHmalEDEST, utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *NsiI*. También en este plásmido, IPNS será producido como una proteína de fusión MBP.

Se construyó un tercer banco en el que se introdujeron mutaciones en posiciones específicas dentro del gen *pcbC* de *A. nidulans* (estrategia dirigida al sitio). Estas posiciones se seleccionaron en base a dos criterios: a) la creación de espacio en el centro activo y b) la debilitación de la unión del extremo C.

40 La creación de espacio en el centro activo puede ser beneficiosa para mejorar la actividad de la IPNS nativa sobre HpgCV, dado que el resto Hpg es mayor que el resto α -aminoácido en ACV.

45 El extremo C de la molécula IPNS actúa como un casi-sustrato, cuando la enzima no está cargada con un sustrato. Tras la aproximación del sustrato al centro activo, se retira el extremo C, creando espacio para el sustrato. Con el fin de prevenir esta competición entre el extremo C y el sustrato se introdujeron aquí asimismo interacciones.

Se seleccionaron ocho posiciones de aminoácidos para la modificación: I75, Y91, S183, V185, N287, L321, L324 y T331.

50 Se diseñaron cebadores, 33-meros, en los que los tres nucleótidos centrales (que codifican el aminoácido a modificar) se eligieron al azar (NNN), creando así la posibilidad de que cualquier aminoácido estuviese presente en la molécula de IPNS resultante en las posiciones indicadas.

55 Todas las ocho posiciones se modificaron de esta forma mediante PCR de fusión, dando como resultados ocho sub-bancos, cada uno con mutaciones sencillas en el sitio. Se preparó un banco adicional en el que todas las mutaciones se combinaron de una manera aleatoria.

También en este caso, los insertos del banco, así obtenido, se subclonaron en el vector de expresión pBADMHmalEDEST, utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *NsiI*.

60 Los tres bancos se extendieron a partir de materiales de glicerol sobre medio de agar selectivo que contenía 50 μ g de zeocina por ml. De cada uno de los bancos EP-PCR, se recogieron 2500 clones independientes y se utilizaron

para inocular 150 µl de medio 2xTY que contenía 50 µg de zeocina por ml en placas de 96 pocillos. Del banco dirigido al sitio se recogieron 200 clones de cada sub-banco para la inoculación de 150 µl de medio 2xTY que contenía 50 µg de zeocina por ml en placas de 96 pocillos.

- 5 Después del crecimiento durante una noche a 37°C y 280 rpm, 5 µl de los cultivos confluyentes se transfirieron a 1 ml de medio 2xTY reciente que contenía 50 µg de zeocina por ml en una placa de pocillos profundos. Se permitió el crecimiento a 37°C y 280 rpm hasta que la DO⁶⁰⁰ alcanzó un valor entre 0,4 y 0,6 de promedio a lo largo de la microplaca. Se indujo a las células a producir la proteína de fusión MBP-IPNS mediante la adición de 40 µl de L-arabinosa al 5% a cada uno de los pocillos individuales. Subsiguientemente, las células se hicieron crecer durante 10 24 horas a 22°C y 220 rpm.

Las células se recolectaron mediante centrifugación. El sobrenadante se desechó y los sedimentos de células se congelaron durante una noche a -20°C.

- 15 A cada uno de los pocillos que contenían un sedimento de células se añadieron 100 µl de tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,0; 0,5 mg/ml de lisozima; 0,1 mg/ml de DNAsal; DTT 5 mM; MgSO₄ 5 mM), seguido de incubación a la temperatura ambiente durante 30 minutos.

- 20 Las microplacas se centrifugaron y 50 µl del sobrenadante se transfirieron a una microplaca reciente. Al sobrenadante se añadieron 50 µl de mezcla de ensayo (HEPES 50 mM pH 7,0; TCEP 1 mM; ascorbato de Na 100 µM; sulfato de Fe 25 µM, HpgCV 5 mM), seguido de incubación durante 30 minutos a 25°C. Se añadieron 125 µl de un cultivo de *M. luteus* diluido en 2xTY (la DO⁶⁰⁰ final es 0,01). La placa se incubó durante una noche a 30°C. La DO⁶⁰⁰ se leyó utilizando un lector de microplacas.

- 25 18 clones, 16 procedentes del sub-banco V185 y 2 del sub-banco recombinado se seleccionaron del banco de *A. nidulans* dirigido al sitio. Todos estos clones mostraron una inhibición completa del crecimiento de *M. luteus*, indicando que se formó un compuesto que inhibía el crecimiento de la cepa indicadora. Esta inhibición se volvió a someter a ensayo de acuerdo con el protocolo anterior y de nuevo era positivo. Además de ello, la inhibición estaba ausente tras la adición de Penase[®], indicando que el compuesto inhibidor es una β-lactama.

- 30 Los clones positivos se hicieron crecer en 10 ml de 2xTY con 50 µg de zeocina por ml. Como fuente de control de IPNS se incluyó en el ensayo pBAD-AnpcbC. Después del crecimiento durante una noche a 37°C y 280 rpm se determinó la DO⁶⁰⁰. 100 ml de medio 2xTY que contenía 50 µg de zeocina por ml se inocularon hasta una DO⁶⁰⁰ inicial de 0,015. Las células se hicieron crecer a 37°C y 280 rpm hasta que la DO⁶⁰⁰ alcanzó un valor de 0,4 a 0,6 La producción de la proteína de fusión MBP-IPNS se indujo mediante la adición de L-arabinosa hasta una 35 concentración final de 0,2%. El crecimiento se mantuvo a 22°C y 220 rpm durante una noche. Las células se recolectaron y lavaron y congelaron durante una noche a -20°C. Los lisados de células se prepararon mediante la adición de 1,5 ml de tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,0; 0,5 mg/ml de lisozima; 0,1 mg/ml de ADNasal; DTT 5 mM; MgSO₄ 5 mM), seguido de incubación a la temperatura ambiente durante 30 minutos. El extracto se centrifugó 40 y el sobrenadante (CFE) se pipeteó a un tubo reciente.

Se realizaron dos bioensayos:

- 45 1) Un bioensayo líquido: 8 µl del CFE se mezclaron con 592 µl de mezcla de ensayo (HEPES 50 mM pH 7,0; TCEP 1 mM; ascorbato de Na 100 µM; sulfato de Fe 25 µM, HpgCV 5 mM). Después de incubación durante 10 minutos a 25°C, se añadieron 125 µl de un cultivo de *M. luteus* diluido en 2xTY (la DO⁶⁰⁰ final es 0,01). Como sustratos control se utilizó ACV (se puede utilizar tanto LLD- como DLD-PgCV, a pesar de que el sustrato preferido es DLD-PgCV). Además, para cada una de las muestras se incluyó un control extra en el que se añadió Pensase[®] a la mezcla de ensayo. Después de crecimiento durante una noche a 30°C, se leyó la DO⁶⁰⁰.

- 50 2) Un bioensayo en placas de agar: 8 µl del CFE se mezclaron con 592 µl de la mezcla de ensayo (HEPES 50 mM pH 7,0; TCEP 1 mM; ascorbato de Na 100 µM; sulfato de Fe 25 µM, HpgCV 5 mM). Después de incubación durante 10 minutos a 25°C, se esparcieron 50 µl de la mezcla de ensayo en una placa de agar en la que se practicaron agujeros. De cada una de las muestras se incluyó un control extra en el que se añadió Pensase[®] a la mezcla de 55 ensayo. El agar consistía en agar 2xTY suplementado con *M. luteus* hasta una DO⁶⁰⁰ final de 0,01. Después de incubación durante una noche a 30°C, se puntuó la presencia o ausencia de zonas claras debido a la acción de β-lactamas.

- 60 La Tabla 5 muestra una perspectiva general de la actividad de algunos de los mutantes. Cada uno de los mutantes representa un grupo mayor de mutantes con una actividad de IPNS comparable sobre HpgCV en calidad de un sustrato. La actividad de las enzimas IPNS de tipo salvaje de *A. nidulans* en *S. clavuligerus* se encontraba por debajo del límite de detección en estos ensayos de rastreo.

Tabla 5: Perspectiva general de los bioensayos sobre la actividad de IPNS de los clones y controles seleccionados

Clon	Sustrato	Bioensayo líquido		Bioensayo en agar	
		Como tal	Con Penase®	Como tal	Con Penase®
35A12	HpgCV	+	-	+	-
35F1	HpgCV	+	-	+	-
36A4	HpgCV	+	-	+	-
36F3	HpgCV	+	-	+	-
36C4	HpgCV	+	-	+	-
A. nid. tipo salvaje	HpgCV	-	-	-	-
S. cla. tipo salvaje	HpgCV	-	-	-	-
35A12	ACV	+	-	+	-
36F3	ACV	+	-	+	-
A. nid. tipo salvaje	ACV	+	-	+	-
35A12	PgCV	+	-	+	-
36F3	PgCV	+	-	+	-
A. nid. tipo salvaje	PgCV	-	-	-	-

5 Todos los clones positivos en el rastreo se sometieron a análisis de la secuencia y los clones representativos se
sometieron a análisis LC/MS. El análisis LC/MS se realizó permitiendo la identificación de los productos formados
en base al tiempo de retención, la masa del compuesto y el modelo de fragmentación del producto. La cantidad de
amoxicilina que se produce se determinó mediante el método de adición estándar y se expresa en AU/mg de
proteína, en donde AU representa la cantidad de amoxicilina (en ng) formada en 10 minutos bajo las condiciones de
reacción especificadas. La Tabla 6 resume los clones, los residuos aminoácidos cambiados y la actividad de los
10 clones en HpgCV (en AU de amoxicilina/mg de proteína en el CFE de *E. coli*).

Tabla 6: Perspectiva general de las mutaciones y la actividad sobre HpcCV de los mutantes IPNS activos

Mutante	Actividad (AU/mg de proteína)	Posición en IPNS de <i>A. nidulans</i>						
		111	135	185	190	211	293	331
36A4	1120			V185R				
35A12	90			V185K				
35F1	130			V185K			V293A	
36F3	50	T111A	H135R	V185R				
35H12	30			V185K	P190H			
36C4	n.d.			V185H				T331C
Tipo salvaje	n.d.							

n.d. = no detectable

15

Ejemplo 14

Conversión de DLD-PgCV en ampicilina

20 La actividad de los clones *pcbC* mutantes 36A4 (V185R), 35A12 (V185K), 35F1 (V185K, V293A), 36F3 (T111A,
H135R, V185R), 35H12 (V185K, P190H), 36C4 (V185H, T331C) y el gen *pcbC* de tipo salvaje de *A. nidulans* se
determinó sobre DLD-PgCV como sustrato. Para este fin, los clones se cultivaron en 10 ml de 2xTY con 50 µg de
zeocina por ml. Después del crecimiento durante una noche a 37°C y 280 rpm se determinó la DO⁶⁰⁰. 100 ml de
medio 2xTY que contenía 50 µg de zeocina por ml se inocularon hasta una DO⁶⁰⁰ inicial de 0,015. Las células se
hicieron crecer a 37°C y 280 rpm hasta que la DO⁶⁰⁰ alcanzó un valor de 0,4 a 0,6 La producción de la proteína de
25 fusión MBP-IPNS se indujo mediante la adición de L-arabinosa hasta una concentración final de 0,2%. El
crecimiento se mantuvo a 22°C y 220 rpm durante una noche. Las células se recolectaron y lavaron y congelaron a
-20°C durante una noche. Se prepararon lisados de células mediante la adición de 1,5 ml de tampón de lisis
(HEPES 50 mM, pH 7,0; 0,5 mg/ml de lisozima; 0,1 mg/ml de ADNasaI; DTT 5 mM; MgSO₄ 5 mM), seguido de
30 incubación a la temperatura ambiente durante 30 minutos. El extracto se centrifugó y el sobrenadante (CFE) se
pipeteó a un tubo reciente.

8 µl del CFE se mezclaron con 592 µl de mezcla de ensayo (HEPES 50 mM pH 7,0; TCEP 1 mM; ascorbato de Na
100 µM; sulfato de Fe 25 µM, PgCV 5 mM). Después de incubación durante 10 minutos a 25°C, se añadieron 100 µl
35 de un cultivo de *M. luteus* diluido en 2xTY (la DO⁶⁰⁰ final es 0,01) a 50 µl de la mezcla de reacción. Como sustrato
control se utilizó ACV Además, para cada una de las muestras se incluyó un control extra en el que se añadió

Penase[®] a la mezcla de ensayo. Después de crecimiento durante una noche a 30°C, se leyó la DO⁶⁰⁰. Todas las muestras, incluso la proteína de fusión IPNS de *A. nidulans* de tipo salvaje a MBP, dieron sorprendentemente como resultado la inhibición del crecimiento de *M. luteus*.

- 5 El análisis LC/MS se realizó en estas muestras permitiendo la identificación de los productos formados en base al tiempo de retención, la masa del compuesto y el modelo de fragmentación del producto. La cantidad de ampicilina que se produjo se determinó mediante el método de adición estándar. En la Tabla 7 se ha resumido la actividad sobre PgCV.
- 10 Tabla 7: Actividad de las proteínas de fusión MBP-IPNS mutante y de tipo salvaje sobre PgCV (en ng de producto por mg de proteína total, por 10 minutos) según se determina mediante análisis LC-MS

Mutante	Actividad (AU/mg de proteína)	Posición en IPNS de <i>A. nidulans</i>						
		111	135	185	190	211	293	331
36A4	900			V185R				
35A12	150			V185K				
35F1	150			V185K			V293A	
36F3	30	T111A	H135R	V185R				
35H12	50			V185K	P190H			
36C4	1.			V185H				T331C
Tipo salvaje	1.							

Ejemplo 15

- 15 **Construcción de una cepa de *Penicillium* que produce D-Hpg o L-Hpg**
- 15a **Construcción de plásmidos de expresión de *Penicillium***
- 20 Los genes de la hidroximandelato sintasa procedentes de *Amycolatopsis orientalis* y *Streptomyces coelicolor* (*hmaS*) y los genes que codifican hidroxifenilglicina aminotransferasa (*hpgAT* de *Pseudomonas putida* y *hpgT* de *Streptomyces coelicolor*, respectivamente) se clonaron en el plásmido pIPCLTA mediante amplificación por PCR de estos genes a partir de los diferentes plásmidos pBAD correspondientes, descritos en el documento WO 02/34921. El gen *mdlB*, que codifica mandelato deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* se amplificó a partir de pGEM-Bldm.
- 25 Se eligió la inserción en los sitios *NdeI* y *NsiI* de pIPCLTA, conduciendo a una fusión ATG del gen apropiado con el promotor de *Penicillium*. Todos los genes se amplificaron mediante PCR, y los cebadores de amplificación se construyeron introduciendo un sitio de restricción *NdeI* en el cebador situado aguas arriba y un sitio de restricción *NsiI* en el cebador situado aguas abajo. Debido a que los genes *hpgAT* de *Pseudomonas putida* contienen un sitio *NsiI* interno, se llevó a cabo una estrategia alternativa en la que el inserto se amplificó utilizando cebadores que
- 30 introducían sitios *NdeI* y *BsaI*. El fragmento de PCR con los sitios *NdeI/BsaI* adicionales se subclonó como un fragmento de extremos romos en el vector de clonación pCR-blunt-TOPO (Invitrogen), conduciendo a la construcción de *pCR-bl-hpgATp_p*. Después de que la determinación de la secuencia revelara que ésta contenía el inserto correcto que incluía los sitios *NdeI/BsaI* flanqueantes, este plásmido se utilizó para la construcción de pIPphgATgWA clonando el fragmento *NdeI/BsaI* que contenía el gen *hpgATp_p* en el sitio *NdeI/Ppu10I* de pIPCLTA.

35 En pIPCLTA, los genes introducidos en este vector se encuentran bajo el control del promotor *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*. Además, el terminador de la transcripción del gen *penDE*, que codifica acetiltransferasa, ha sido utilizado en estas construcciones.

- 40 Se construyeron las siguientes casetes de expresión:

Vector de expresión	Gen	Proteína codificada	Promotor	Terminador
pIAohmaSgWA	<i>Ao-hmaS</i>	p-hidroximandelato sintasa	<i>pcbC</i>	<i>penDE</i>
pIScohmaSgWA	<i>Sco-hmaS</i>	p-hidroximandelato sintasa	<i>pcbC</i>	<i>penDE</i>
pIPpmdlBgWA	<i>Pp-mdlB</i>	L-mandelato deshidrogenasa	<i>pcbC</i>	<i>penDE</i>
pIPphgATgWA	<i>Pp-hpgAT</i>	L-p-hidroxifenilglicina aminotransferasa	<i>pcbC</i>	<i>penDE</i>
pIScohpgTgWA	<i>Sco-hpgT</i>	L-p-hidroxifenilglicina aminotransferasa	<i>pcbC</i>	<i>penDE</i>

Se utilizaron los siguientes cebadores en la amplificación por clonación de los genes arriba mencionados:

A: Genes de *Amycolatoasis orientalis*

Construcción de pIAohmaSgWA

hmaS-Ao-Nde: 5'-CAGGAGGAATTACATATGCAGAAATTTTCGAG (SEQ ID NO: 28)

5 hmaS-Ao-Nsi: 5'-CGGCCAGGGATGCATACGTCATCGCCGAGC (SEQ ID NO: 29)

B: Genes de *Streptomyces coelicolor*

Construcción de pIScohmaSgWA

hmaS-Sc-Nde: 5'-CAGGAGGAATTACATATGCCGCCAGTGAC (SEQ ID NO: 30)

10 hmaS-Sc-Nsi: 5'-GAATTCCCATATGCATCCAGGTCATCGGCC (SEQ ID NO: 31)

Construcción de pIScohpGtGWA

hpgT-Sc-Nde: 5'-CAGGAGGAATTACATATGACCACCACCACC (SEQ ID NO: 32)

15 hpgT-Sc-Nsi: 5'-TCCCATATGCATCCTCAACCGTTAGACGCC (SEQ ID NO: 33)

C: Genes de *Pseudomonas putida*

Construcción de pIPpmdIBgWA

hpgT-Sc-Nde: 5'-GTGAGGTAACATATGAGCCAGAATCTCTTT (SEQ ID NO: 34)

20 hpgT-Sc-Nsi: 5'-GTAATCAATGCATCACTCATGCGTGTGTTC (SEQ ID NO: 35)

Construcción de pIPphgATgWA

hpgAT-Nde 5'-CAGGAGGAATTACATATGTCTATTTATAGC (SEQ ID NO: 36)

25 hpgAT-BsaI 5'-GTCCTC**GGTCTC**ATGCATCTCGAGTTAGCCCAGGAGGT (SEQ ID NO: 37)

15b Transformación de *Penicillium chrysogenum*

Los plásmidos pIAohmaSgWa, pIScohmaSgWA, pIPpmdIBgWA, pIPphgATgWA y pIScohpGtGWA se cortaron con *NotI*, que escinde la casete de expresión a partir del vector.

30 *Penicillium chrysogenum* DS12975, una cepa productora de penicilina industrial de DSM, se transformó con 4 µg de ADN (es decir, las digestiones *NotI*) y 0,25 µg de un fragmento marcador de la selección. En este caso, se utilizó un fragmento que confiere resistencia a fleomicina.

Se transformaron las siguientes combinaciones de casetes de expresión:

Transformación	Gen 1	Gen 2	Gen 3
1	<i>Sc-hmaS</i>	<i>Pp-mdIB</i>	<i>Pp-hpgAT</i>
2	<i>Ao-hmaS</i>	<i>Pp-mdIB</i>	<i>Pp-hpgAT</i>
3	<i>Sc-hmaS</i>	<i>Pp-mdIB</i>	<i>Sc-hpgT</i>
4	<i>Ao-hmaS</i>	<i>Pp-mdIB</i>	<i>Sc-hpgT</i>

La selección de transformantes se realizó en placas de agar de medio mineral con 1 gramo por litro y sacarosa 1 M. Colonias resistentes a fleomicina que aparecen tras la regeneración de protoplastos se volvieron a sembrar sobre placas de agar de fleomicina recientes sin sacarosa y se hicieron crecer hasta la esporulación.

40 Los transformantes se sembraron en el mismo medio y la integración de los casetes de expresión se verificó mediante PCR utilizando cebadores específicos para los genes individuales.

45 Transformantes que contienen los tres genes pretendidos se sembraron en tubos inclinados de agar y se esporularon en arroz.

Para el análisis adicional se seleccionaron las siguientes cepas:

Cepa	Genes integrados en el genoma
AFF108	<i>Ao-hmaS, Pp-mdIB, Pp-hpgAT</i>
AFF133	<i>Ao-hmaS, Pp-mdIB, Pp-hpgAT</i>
AFF146	<i>Sc-hmaS, Pp-mdIB, Pp-hpgAT</i>
AFF152	<i>Sc-hmaS, Pp-mdIB, Pp-hpgAT</i>
AFF158	<i>Ao-hmaS, Pp-mdIB, Sc-hpgT</i>
AFF162	<i>Ao-hmaS, Pp-mdIB, Sc-hpgT</i>
AFF164	<i>Ao-hmaS, Pp-mdIB, Sc-hpgT</i>

AFF191	<i>Sc-hmaS, Pp-mdlB, Sc-hpgT</i>
AFF193	<i>Sc-hmaS, Pp-mdlB, Sc-hpgT</i>
AFF195	<i>Sc-hmaS, Pp-mdlB, Sc-hpgT</i>

15c Producción fermentativa de D-Hpg mediante transformantes de *Penicillium*

5 Transformantes de *Penicillium chrysogenum* AFF108, AFF133, AFF146 y AFF152 se cultivaron en matraces agitados durante 6 días. Productos intracelulares y extracelulares se determinaron mediante RMN.

Tabla 8: Concentraciones intracelulares de D-Hpg detectadas mediante RMN. Las células se hicieron crecer durante 3 a 6 días.

Cepa	D-Hpg ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)	
	Día 3	Días 4-6
DS12975	0	0
AFF108	40	0
AFF133	80	0
AFF146	40	0
AFF152	40	0

10 Las células se hicieron crecer durante 3, 4, 5 y 6 días para encontrar un óptimo para la producción de D-Hpg. La concentración al cabo de 3 días era lo suficientemente elevada para detectar picos en el espectro de RMN y para cuantificar el contenido en D-Hpg. Todos los transformantes seleccionados producían niveles detectables de D-Hpg, pero la concentración de D-Hpg más elevada se observó en AFF133 (80 $\mu\text{g/g}$ de DW). Los resultados se listan en la Tabla 8.

15d Producción fermentativa de L-Hpg mediante transformantes de *Penicillium*

20 Las cepas de *Penicillium chrysogenum* AFF158, AFF162, AFF164, AFF191, AFF193 y AFF195, que contenían los genes de biosíntesis de L-Hpg, se cultivaron en matraces agitados durante 3, 4, 5 y 6 días. Los productos intracelulares y extracelulares se determinaron mediante RMN. De nuevo, no se podía detectar producto extracelular alguno, pero se percibieron intracelularmente concentraciones sustancias de L-Hpg (véase la Tabla 9).

25 Las concentraciones intracelulares de L-Hpg podían ser cuantificadas para todas las cepas y están listadas en la Tabla 6. A diferencia de las concentración de D-Hpg, las concentraciones de L-Hpg aumentaron con el tiempo y alcanzaron un óptimo alrededor de los 5 ó 6 días de crecimiento. En el micelio de AFF195, se midió la concentración más elevada que era 2,6 mg de L-Hpg por gramo de peso seco. Las cepas productoras de L-Hpg aumentaron aproximadamente 30 veces la concentración intracelular mayor que la AFF133, el productor de D-Hpg más elevado.

Tabla 9: Concentraciones intracelulares de L-Hpg detectadas mediante RMN.

Cepa	L-Hpg ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)			
	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
DS12975	0	0	0	0
AFF158	360	340	180	380
AFF162	740	880	940	2200
AFF164	1160	1020	960	1880
AFF191	620	860	860	2060
AFF193	600	680	1600	740
AFF195	740	680	1040	2640

35 En un experimento siguiente, las células se cultivaron durante 5, 6 y 7 días, pero después de 5 ó 6 días, la concentración de L-Hpg no aumentaba adicionalmente, sino que comenzó a disminuir (datos no mostrados).

Ejemplo 16

40 Producción fermentativa de amoxicilina por parte de *P. chrysogenum*

Una cepa de *Penicillium chrysogenum* desprovista de los racimos biosintéticos de penicilina según se describe en

la solicitud de patente PCT/EP2007/054045 se transformó con combinaciones de 1) el plásmido pEXPR-NRPS6 (véase la Tabla 1) que alberga un gen NRPS que codifica HpgCVS (DLD-Hpg-Cys-Val sintetasa), 2) un plásmido que alberga el gen que codifica V185R mutante de IPNS y 3) un plásmido que alberga el gen *gsp* procedente de *Bacillus brevis*, que codifica una Ppant transferasa (PPT) bajo el control del promotor *gpdA*.

- 5 La selección de transformantes se realizó en placas de agar de medio mineral con 50 µg de fleomicina por ml y sacarosa 1 M. Colonias resistentes a fleomicina que aparecen tras la regeneración de protoplastos se volvieron a sembrar en placas de agar de fleomicina recientes sin sacarosa, y se hicieron crecer hasta la esporulación.
- 10 De cada una de las transformaciones, aproximadamente 100 colonias se hicieron crecer sobre medio mineral. Adicionalmente, se añadió el aminoácido L-Hpg a una concentración que variaba desde 1 mM a 10 mM. El cultivo se llevó a cabo en la escala del matraz agitado o en placas de microtitulación de 24 pocillos. La incubación se realizó a 25°C durante una semana a 200 rpm.
- 15 En varios instantes (4 días, total 7 días) se tomaron muestras. El caldo se centrifugó con el fin de separar el micelio. Se separó una muestra de caldo total y se liofilizó. Tanto la muestra de caldo liofilizada como el sobrenadante se analizaron en cuanto a la presencia de amoxicilina.
- 20 En el caso del sobrenadante, 10 y 50 µl del sobrenadante se añadieron 190 y 150 µl, respectivamente, de un cultivo de *M. luteus* diluido, según se describe en el Ejemplo 2. Como control se añadió Penase[®] a la muestra, que degrada amoxicilina. Varios transformantes mostraron una inhibición del crecimiento de *M. luteus*, indicando la acción de amoxicilina producida por el transformante. La adición de Penase[®] evitó la inhibición del crecimiento de *M. luteus*.
- 25 Las muestras de caldo liofilizadas se trataron con 100 – 500 µl de agua milliQ caliente (90°C; volumen dependiendo de la cantidad de biomasa) con el fin de preparar un lisado. 10 µl y 50 µl del lisado se mezclaron 150 µl y 190 µl de un cultivo de *M. luteus* diluido, respectivamente, según se describe arriba. Asimismo se añadió un control de Penase[®]. También en este caso, varias muestras inhibían el crecimiento de *M. luteus*. Los extractos positivos correspondían a las muestras de sobrenadante. Se confirmó que la identidad de la β-lactama que se formaba era amoxicilina mediante LC/MS/MS, según se describe en el Ejemplo 9.
- 30

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> DSM IP Assets B.V.
- <120> Producción de antibióticos de beta-lactama
- <130> 25649WO
- <160> 37
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 331
- <212> PRT
- <213> Emericella nidulans
- <400> 1

```

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

```

ES 2 447 491 T3

Leu Ser Phe Glu Trp His Glu Asp Val Ser Leu Ile Thr Val Leu Tyr
 210 215 220

Gln Ser Asn Val Gln Asn Leu Gln Val Glu Thr Ala Ala Gly Tyr Gln
 225 230 235 240

Asp Ile Glu Ala Asp Asp Thr Gly Tyr Leu Ile Asn Cys Gly Ser Tyr
 245 250 255

Met Ala His Leu Thr Asn Asn Tyr Tyr Lys Ala Pro Ile His Arg Val
 260 265 270

Lys Trp Val Asn Ala Glu Arg Gln Ser Leu Pro Phe Phe Val Asn Leu
 275 280 285

Gly Tyr Asp Ser Val Ile Asp Pro Phe Asp Pro Arg Glu Pro Asn Gly
 290 295 300

Lys Ser Asp Arg Glu Pro Leu Ser Tyr Gly Asp Tyr Leu Gln Asn Gly
 305 310 315 320

Leu Val Ser Leu Ile Asn Lys Asn Gly Gln Thr
 325 330

- <210> 2
- <211> 1106
- <212> PRT
- <213> Streptomyces coelicolor

<400> 2

Met Ala Thr Leu Pro Glu Leu Phe Ala Glu Gln Ala Leu Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Ala Leu Val Arg Gly Gly Thr Thr Val Ser Tyr Ala Glu
 20 25 30

Leu Asp Leu Arg Thr Asn Arg Leu Ala Arg Leu Leu Arg Gln Gln Gly
 35 40 45

Val Arg Pro Gly Thr Pro Val Val Met Leu Met Glu Arg Ser Pro Ala
 50 55 60

His Val Val Ala Thr Leu Ala Ile Ala Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val
 65 70 75 80

Pro Leu His Asp Thr Tyr Pro Leu Asp Arg Met Arg His Val Val Ala
 85 90 95

Asp Thr Ala Ala Thr Leu Ile Leu Thr Asp Arg Ala Glu Ala Ala Arg
 100 105 110

ES 2 447 491 T3

Ala Gly Gln Leu Gly Ala Arg Val Met Val Val Asp Glu Phe Gly Ala
 115 120 125

Ala Pro Ser Gly Ser Glu Ala Asp Ala Ala Pro Gly Thr Gly Thr Gly
 130 135 140

Thr Gly Thr Gly Ser Arg Ser Gly Tyr Val Asp Asp Ala Pro Glu Val
 145 150 155 160

Gly Leu Arg Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Met Tyr Thr Ser Gly Ser
 165 170 175

Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Ala Val Thr His Arg Gly Val Val Asp
 180 185 190

Leu Val Arg Asp His Cys Trp Arg Pro Gly Val His Glu Arg Val Leu
 195 200 205

Leu His Ala Pro His Ala Phe Asp Val Ser Cys Tyr Glu Met Trp Val
 210 215 220

Pro Leu Val Ser Gly Gly Thr Val Val Val Ala Pro Pro Gly His Leu
 225 230 235 240

Asp Pro Ala Ala Ile Thr Asp Leu Ile Thr Ala His Asp Ile Thr Ala
 245 250 255

Ile His Leu Thr Ala Gly Phe Phe Arg Val Val Ala Glu Glu Ala Pro
 260 265 270

Glu Cys Phe Ala Gly Val Arg Glu Val Leu Thr Gly Gly Asp Val Val
 275 280 285

Ser Pro Ala Ala Val Ala Arg Val Leu Ala His His Pro Arg Ile Val
 290 295 300

Leu Arg His Leu Tyr Gly Pro Thr Glu Thr Thr Leu Cys Val Thr Gln
 305 310 315 320

His Glu Val Thr Ala Pro Tyr Glu Ala Arg Gly Ser Leu Pro Val Gly
 325 330 335

Arg Ala Thr Gly Asn Thr Arg Ala Tyr Val Leu Asp Arg Tyr Leu Gln
 340 345 350

Pro Val Pro Ala Gly Val Pro Gly Glu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Gly
 355 360 365

Leu Ala Arg Gly Tyr Leu Asp Arg Pro Asp Leu Thr Cys Glu Arg Phe
 370 375 380

Val Ala Asp Pro Tyr Gly Gly Ser Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly

ES 2 447 491 T3

385					390						395				400
Asp	Leu	Val	Arg	Tyr	Asn	Ala	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Ala	Arg
				405					410					415	
Ala	Asp	Asp	Gln	Val	Lys	Ile	Arg	Gly	Phe	Arg	Val	Glu	Leu	Gly	Glu
			420					425						430	
Ile	Glu	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Arg	Pro	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala	Ala	Val
		435					440					445			
Val	Val	Arg	Glu	Asp	Arg	Pro	Gly	Asp	Arg	Arg	Leu	Val	Gly	Tyr	Val
		450				455						460			
Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Gly	Glu	Val	Asp	Pro	Asp	Ala	Leu	Arg
465					470					475					480
Ala	Phe	Ser	Arg	Gln	Ala	Leu	Pro	Asp	Tyr	Met	Val	Pro	Ser	Ala	Phe
				485					490					495	
Val	Val	Leu	Gly	Thr	Leu	Pro	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Lys	Leu	Asp	Arg
			500					505					510		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Asp	Tyr	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gly	Arg	Ala
		515					520						525		
Ala	Arg	Thr	Pro	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Cys	Thr	Leu	Phe	Ala	Gln	Val
	530					535					540				
Leu	Gly	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	Val	Asp	Asp	Gly	Phe	Phe	Asp	Leu	Gly
545					550					555					560
Gly	Asp	Ser	Ile	Leu	Ser	Ile	Gln	Leu	Val	Ser	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala
				565					570					575	
Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Arg	Asp	Val	Phe	Glu	His	Gln	Ser	Thr	Ala
			580					585					590		
Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Asp	Arg	Asp	Asp	Ala	Ala	Ser	Val	Pro
		595					600					605			
Glu	Ala	Glu	Ala	Val	Pro	Pro	Tyr	Gly	Pro	Ala	Pro	Leu	Thr	Pro	Val
		610				615						620			
Met	Ala	Arg	Ile	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Asp	Asp	Phe	Asn	Gln
625					630					635					640
Ser	Val	Val	Val	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Val	Asp	Arg	Asp	Arg	Leu	Val
				645					650					655	
Pro	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Leu	Asp	His	His	Asp	Ala	Leu	Arg	Leu	Arg
			660					665					670		

ES 2 447 491 T3

Val Leu Pro Asp Gly Ser Thr Glu Val Arg Ala Pro Gly Ser Val Pro
 675 680 685
 Ala Ala Asp Val Leu Ser Val Val Thr Arg Ala Pro Gly Ala Thr Gly
 690 695 700
 Glu Ala Arg Asp Ala Leu Leu Val Glu Ala Ala Cys Ala Ala Arg Asp
 705 710 715 720
 Arg Leu Ala Pro Ala Glu Gly Arg Met Leu Gln Ala Val Leu Val Asp
 725 730 735
 Gly Thr Asp Asp Thr Asp Gly Thr Gly Gly Thr Ser Gly Ala Asp Gly
 740 745 750
 Val Leu Ile Leu Val Ala His His Leu Val Val Asp Ser Val Thr Trp
 755 760 765
 Ser Ile Val Val Pro Asp Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Glu Glu Pro
 770 775 780
 Ala Pro Val Gly Thr Ser Trp Arg Gln Trp Ala Thr Ser Leu Ala Arg
 785 790 795 800
 Leu Ala Thr Asp Pro Arg Val Glu Ala Glu Thr Ala His Trp Glu His
 805 810 815
 Thr Leu Thr Gly Ala Gly Thr Leu Arg Leu Asp Arg Gly Arg Asp Leu
 820 825 830
 Gln Gly Asp Ala Gly Arg Ile Ser Leu Asp Leu Ala Pro His Thr Thr
 835 840 845
 Glu Ala Leu Leu Thr Arg Leu Pro Gly Gly Val Asn Ala Ser Val His
 850 855 860
 Asp Val Leu Leu Thr Ala Phe Ala Phe Ala Val Ala Gly Trp Arg Arg
 865 870 875 880
 Gly Arg Gly Glu Asp Pro Asp Ala Pro Val Val Leu Asp Leu Glu Ser
 885 890 895
 His Gly Arg His Glu Glu Ala Val Pro Gly Ala Glu Leu Ser Arg Thr
 900 905 910
 Ala Gly Trp Phe Thr Ala Leu His Pro Val Arg Leu Ala Pro Asp Val
 915 920 925
 Thr Asp Trp Ala Arg Leu His Gln Asp Gly Asp Ala Leu Arg Asp Gly
 930 935 940

ES 2 447 491 T3

Leu Lys Gln Val Lys Glu Gln Leu Arg Ser Val Pro Gly Asp Gly Leu
 945 950 955 960

Gly His Gly Leu Leu Arg His Leu Asn Pro Thr Ala Gly Pro Arg Leu
 965 970 975

Ala Arg Leu Pro Glu Pro Asp Phe Gly Phe Asn Tyr Leu Gly Arg Arg
 980 985 990

Val Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Glu Pro Trp Thr Val Thr Gly Gl
 995 1000 1005

Gly Leu Ala Ala Ser Arg Pro Thr Ala Pro Met Ala His Ala Val
 1010 1015 1020

Glu Leu Ser Ala Val Val His Glu Gly Ala Asp Gly Pro Arg Leu
 1025 1030 1035

Arg Ala Glu Trp Thr Tyr Ala Arg Arg Leu Val Pro Asp His Asp
 1040 1045 1050

Ala Arg Arg Leu Ala Glu Gln Trp Phe Arg Ala Leu Glu Ala Leu
 1055 1060 1065

Val Glu Gln Ala Asp Arg Ala Gly Thr Gly Gly Leu Thr Pro Ser
 1070 1075 1080

Asp Val Thr Leu Gly Ser Leu Ser Gln Ser Glu Ile Glu Glu Phe
 1085 1090 1095

Glu Ser Asp Leu Glu Ser Glu Trp
 1100 1105

<210> 3
 <211> 3318
 <212> ADN
 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 3

atggcgacgc tgcgggaact gttcgcggag caggcgctcc ggacgcccgg ggcaccggcg 60
 ctggtgcggg gcgggacgac ggtgtcgtac gccgaactcg acctgcgcac caaccggctg 120
 gcccggctgc tgcggcagca gggggtgcgg ccgggcacgc cgggtggtcat gctgatggag 180
 cggtcgcccc cccatgtcgt ggcgacgctg gccatcgcca aggcggggcgg cgcctacgtg 240
 cccctgcacg acacgtatcc cctcgaccgg atcgggcacg tggtagggcga caccgccgcg 300
 acgctgatcc tcaccgaccg ggcggaggcg gcgcggggccg ggcagctcgg cgcgcgggtg 360
 atggtggtcg acgagttcgg cgcggccccg tccggctcgg aggccgacgc ggccccggc 420
 accggcaccg gcaccggcac cggctcgcgc tccgggtacg tcgacgatgc tccggagggtg 480
 gccctgcgcc cgcaggatct cgcgtacgtg atgtacacct ccgggtccac cggggtgccg 540

aagggcgctc	cggtcaccca	ccgcggggtc	gtggaacttg	tccgcgacca	ctgctggcgg	600
ccgggctcc	acgagcgggt	gctgctgcac	gccccgcacg	cgttcgacgt	gtcctgctac	660
gagatgtggg	tgcccctggt	ctcgggcgga	acggtcgctc	tggcaccgcc	cggacacctg	720
gacccggccc	cgatcaccca	cctgatcacc	gctcacgaca	tcaccgcgat	ccacctcacc	780
gcgggcttct	tccgggtcgt	cgcgaggagg	gcaccggagt	gcttcgccgg	tgtgcgggag	840
gtgctgaccg	gcggcgacgt	ggtctcgcca	gcccggttgg	cccgggtcct	cgcgaccac	900
ccgcggatcg	tactgcgtca	cctgtacggg	ccgaccgaga	cgacgctgtg	cgtagcgag	960
cacgaggta	ccgcgccgta	cgaggcccgc	ggcagcctgc	cggtcggggc	ggcgacgggg	1020
aacacccggg	cctacgtgct	cgaccggtac	ctccagccgg	tgccggccgg	cgtagccggc	1080
gagctgttca	tctccggctc	cggtctggcg	cgcgctacc	tggaccgtcc	cgacctgacc	1140
tgtgagcggg	tcgtcgccga	tccgtacggc	gggtccggcg	agcggatgta	ccgcacgggc	1200
gacctggtcc	gctacaacgc	ggcgggcgaa	ctggagtacc	tggcccgcgc	cgacgaccag	1260
gtcaagatcc	gcggcttccg	ggtggaactg	ggcgagatcg	aggcggctct	ggccacgcgc	1320
ccggagctgg	cccaggcccgc	cgctcgtcgc	cgcgaggacc	ggcccggcga	ccggcgcttg	1380
gtcggctacg	tggtgccgc	ggcgggcccg	gacggcgagg	tcgaccggga	cgcgctgcgc	1440
gccttctccc	gccaggcgt	gccggactac	atggtgccgt	cggcgctcgt	ggtcctcggc	1500
accctgccgc	tgaccgcaa	cggaactg	gaccgcaagg	cgctgcccgc	gcccactac	1560
ggggcggcgt	ccaccgggcg	ggccgcccgc	accctgcccg	aggagctgct	gtgcacgctc	1620
ttcggcccagg	tgctcggcct	gtccgcggtg	ggcgtcgacg	acgggttctt	cgatctgggc	1680
ggcgacagca	tcctgtccat	ccagctcgtc	agccgggccc	gcgcccggcg	actcgcctc	1740
gccgtccgcg	acgtcttcca	gcaccagctg	acggcccggc	tggccggcgc	gctgacggac	1800
cgggacgacg	cgccctccgt	gccggaggcc	gaagcgggtg	cgccgtacgg	tcccggcccg	1860
ctgacccccg	tgatggcccg	catcgccgaa	ctgggccttg	gcggagacga	cttcaaccag	1920
tcggctcgtg	tgctcctgcc	gcccgcggtg	gaccgggacc	ggctcgtccc	ggcctgcaa	1980
cgtagtctcg	accaccatga	cgcgctgcgc	ctgcgctcc	tgcccgacgg	gagcacggag	2040
gtacgcgccc	cgggcagtg	gccggccgcg	gacgtcctga	gcgtcgtcac	gcgggcccc	2100
ggcggcaccg	gcgaggcgcg	cgacgcccctg	ctcgtggagg	cggcgtgcgc	cgcacgggac	2160
cggctcgcac	cgcccgagg	ccgcatgctc	caggcgggtc	tggtcgacgg	cacggacgac	2220
acggacggca	cgggcgggac	ctccggggcg	gacggcgtgc	tgatcctggt	cgcccaccac	2280
ctgggtggtc	actcgggtgac	gtggagcatc	gtcgtaccgg	acctcggcgc	ggcctaccgg	2340
ggcgaggagc	ccgcccgggt	gggcacctcg	tggcggcagt	gggcccctc	cctggcacgg	2400
ctggccaccg	acccccgcgt	cgaggcggag	accgcccact	gggagcacac	gctcaccggg	2460
gcgggcaccc	tgcggttgg	ccgcggcccgc	gatctccagg	gcgacggcgg	acgcatcagc	2520
ctcgacctgg	ccccgcacac	gaccgaggcc	ctgctcacgc	gcctgcccgg	gggcgtcaac	2580
gcgagcgtgc	acgacgtcct	gctgaccgcc	ttcgcgttcg	ccgtcggcgg	gtggcggcgc	2640

ES 2 447 491 T3

ggacgcggcg aggacccgga cgcgcccgtc gtgctcgacc tggagagcca cggccggcac 2700
gaggaggcgg tgccggggcg cgaactcagc cgcacggcgg gctgggtcac ggccctccac 2760
ccggtgcggc tggctccgga cgtcaccgac tgggcgcggc tgcaccagga cggcgacgcy 2820
ctccgggacg gcctcaagca ggtgaaggaa cagttgcggc ccgtaccggg cgacggcctc 2880
ggccacggct tgctgcgcca cctcaacccc accgctgggc cccgcctcgc acgccttccc 2940
gagcccgact tcggcttcaa ctacctgggc cgccgggtca ccccgccac cggcaccocg 3000
gaaccgtgga ccgtcacggg cggcggcctc gccgcctcgc ggcccacggc gccgatggcc 3060
cacgcggtgg agctgagcgc cgtcgtccac gagggggcgg acggcccccg actgcgcgcy 3120
gagtgacact acgcacggc cctggctccc gatcacgacg cccgccgcct ggccgagcaa 3180
tggttccggg cgctggaagc cctggtgagg caggccgacc gggccggcac cggcggcctg 3240
acccgtccg acgtgaccct cggctcgcct agccagtcg agatcgagga attcgagtcc 3300
gacctgagt ccgagtgg 3318

<210> 4
<211> 1091
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia híbrida

<400> 4

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

ES 2 447 491 T3

130	135	140
Asp Gln Leu Ala Tyr Ile Met Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro		
145	150	155 160
Lys Gly Ile Gly Ile Thr His Arg Asp Ala Ile Ala Leu Ala Ala Asp		
	165	170 175
Arg Cys Trp Asp Leu Asp Thr Gly Ser Arg Val Leu Met His Ser Pro		
	180	185 190
Tyr Ala Phe Asp Ile Ser Thr Phe Glu Leu Phe Ala Pro Leu Leu Ala		
	195	200 205
Gly Gly Arg Ile Val Val Ala Pro Arg Gly Asp Ile Asp Ala Ala Val		
	210	215 220
Leu Gln Arg Thr Leu Ala Ala His Gly Val Thr Ser Leu Leu Leu Thr		
225	230	235 240
Ala Gly Leu Leu Gly Val Ile Ala Asp Glu Ala Pro Glu Val Phe Thr		
	245	250 255
Gly Val Lys Asp Val Trp Thr Gly Gly Asp Val Val Ser Pro Thr Ala		
	260	265 270
Val Arg Arg Val Leu Glu Ala Cys Pro Gly Thr Val Val Lys Thr Leu		
	275	280 285
Tyr Gly Pro Thr Glu Thr Thr Leu Gly Cys Thr Trp Leu Pro Phe Thr		
	290	295 300
Asp Pro Arg Arg Ile Pro Pro Ala Val Pro Ile Gly Arg Pro Leu Asp		
305	310	315 320
Asn Thr Arg Ala Tyr Val Leu Asp Glu Arg Leu Arg Pro Val Pro Pro		
	325	330 335
Gly Val Thr Gly Glu Leu Tyr Ile Ala Gly Ala Gly Leu Ala Arg Gly		
	340	345 350
Tyr Trp Asp Gln Ser Ala Arg Thr Ala Glu Arg Phe Thr Ala Asp Pro		
	355	360 365
His Ala His Leu Phe Gly Asp Thr Gly Gly Arg Met Tyr Arg Thr Gly		
	370	375 380
Asp Leu Ala Arg Arg Asp Ala Asp Gly Val Leu His Phe Cys Gly Arg		
385	390	395 400
Ala Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly Phe Arg Ile Glu Pro Gly Glu		
	405	410 415

ES 2 447 491 T3

Ile Glu Thr Ala Leu Ala Ala His Pro Asp Val Thr Arg Ala Ala Val
 420 425 430

Val Ala Arg Pro Gly Arg Ala Gly Asp Lys Val Leu Val Ala Tyr Leu
 435 440 445

Val Thr Ala Pro Asp Ala Gly Asp Thr Thr Ala Glu Gln Leu Arg Ala
 450 455 460

Gly Leu Glu Thr Gln Leu Pro Asp Tyr Met Val Pro Ala Ala Phe Val
 465 470 475 480

Ala Leu Pro Ala Leu Pro Val Thr Pro Asn Gly Lys Leu Asp Arg Asp
 485 490 495

Ala Leu Pro Glu Pro Asp Trp Gly Gly Gly Ala Gly Arg Pro Pro Arg
 500 505 510

Gly Pro Arg Glu Glu Ile Leu Cys Gly Leu Phe Ala Glu Val Leu Gly
 515 520 525

Ala Pro Arg Val Gly Thr Asp Asp Asn Phe Phe Glu Leu Gly Gly His
 530 535 540

Ser Met Leu Ala Thr Arg Leu Val Gly Arg Val Lys Thr Val Leu Gly
 545 550 555 560

Ala Asp Ile Gly Val Arg Thr Leu Phe Glu Ala Pro Thr Val Ala Ala
 565 570 575

Leu Ala Ala Arg Ile Asp Gly Ala Asp Ala Ala Ser Val Pro Glu Ala
 580 585 590

Glu Ala Val Pro Pro Tyr Gly Pro Ala Pro Leu Thr Pro Val Met Ala
 595 600 605

Arg Ile Ala Glu Leu Gly Leu Gly Gly Asp Asp Phe Asn Gln Ser Val
 610 615 620

Val Val Ser Leu Pro Pro Ala Val Asp Arg Asp Arg Leu Val Pro Ala
 625 630 635 640

Leu Gln Arg Val Leu Asp His His Asp Ala Leu Arg Leu Arg Val Leu
 645 650 655

Pro Asp Gly Ser Thr Glu Val Arg Ala Pro Gly Ser Val Pro Ala Ala
 660 665 670

Asp Val Leu Ser Val Val Thr Arg Ala Pro Gly Ala Thr Gly Glu Ala
 675 680 685

ES 2 447 491 T3

Arg Asp Ala Leu Leu Val Glu Ala Ala Cys Ala Ala Arg Asp Arg Leu
 690 695 700
 Ala Pro Ala Glu Gly Arg Met Leu Gln Ala Val Leu Val Asp Gly Thr
 705 710 715
 Asp Asp Thr Asp Gly Thr Gly Gly Thr Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu
 725 730 735
 Ile Leu Val Ala His His Leu Val Val Asp Ser Val Thr Trp Ser Ile
 740 745 750
 Val Val Pro Asp Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Glu Glu Pro Ala Pro
 755 760 765
 Val Gly Thr Ser Trp Arg Gln Trp Ala Thr Ser Leu Ala Arg Leu Ala
 770 775 780
 Thr Asp Pro Arg Val Glu Ala Glu Thr Ala His Trp Glu His Thr Leu
 785 790 795 800
 Thr Gly Ala Gly Thr Leu Arg Leu Asp Arg Gly Arg Asp Leu Gln Gly
 805 810 815
 Asp Ala Gly Arg Ile Ser Leu Asp Leu Ala Pro His Thr Thr Glu Ala
 820 825 830
 Leu Leu Thr Arg Leu Pro Gly Gly Val Asn Ala Ser Val His Asp Val
 835 840 845
 Leu Leu Thr Ala Phe Ala Phe Ala Val Ala Gly Trp Arg Arg Gly Arg
 850 855 860
 Gly Glu Asp Pro Asp Ala Pro Val Val Leu Asp Leu Glu Ser His Gly
 865 870 875 880
 Arg His Glu Glu Ala Val Pro Gly Ala Glu Leu Ser Arg Thr Ala Gly
 885 890 895
 Trp Phe Thr Ala Leu His Pro Val Arg Leu Ala Pro Asp Val Thr Asp
 900 905 910
 Trp Ala Arg Leu His Gln Asp Gly Asp Ala Leu Arg Asp Gly Leu Lys
 915 920 925
 Gln Val Lys Glu Gln Leu Arg Ser Val Pro Gly Asp Gly Leu Gly His
 930 935 940
 Gly Leu Leu Arg His Leu Asn Pro Thr Ala Gly Pro Arg Leu Ala Arg
 945 950 955 960

ES 2 447 491 T3

Leu Pro Glu Pro Asp Phe Gly Phe Asn Tyr Leu Gly Arg Arg Val Thr
 965 970 975

Pro Ala Thr Gly Thr Pro Glu Pro Trp Thr Val Thr Gly Gly Gly Leu
 980 985 990

Ala Ala Ser Arg Pro Thr Ala Pro Met Ala His Ala Val Glu Leu Ser
 995 1000 1005

Ala Val Val His Glu Gly Ala Asp Gly Pro Arg Leu Arg Ala Glu
 1010 1015 1020

Trp Thr Tyr Ala Arg Arg Leu Val Pro Asp His Asp Ala Arg Arg
 1025 1030 1035

Leu Ala Glu Glu Trp Phe Arg Ala Leu Glu Ala Leu Val Glu Glu
 1040 1045 1050

Ala Asp Arg Ala Gly Thr Gly Gly Leu Thr Pro Ser Asp Val Thr
 1055 1060 1065

Leu Gly Ser Leu Ser Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Glu Ser Asp
 1070 1075 1080

Leu Glu Ser Glu Trp Leu Ile Asn
 1085 1090

<210> 5
<211> 3436
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia híbrida

<400> 5

agtcttaagc tcgggcccc aataatgatt ttatitttgac tgatagtgac ctgttcggtg 60
caacaaattg atgagcaatg cttttttata atgccaactt tgtacaaaaa agcaggctcc 120
gcgggccgct tgtttaaactt taagaaggag cccttcacca tggcctgcct gccccgccgc 180
atcgccgaac aggccgccc caccgcccgc gcggtcgcgc tcaccgaagc cggcgccacc 240
ctgatcacct acagcgaact cgacgcccgc gccaacggcc tggcccgcca cctgatccgc 300
cgcgggcgta ccgcggagac ccgcgctgcc gtcctcgccg aacgctccgc ccagctcgtc 360
gtcaccacc tgcgatcct caaggccggc ggcgtgtacg tggcctgca caccgctat 420
cccgtcgacc ggatgcbgca cgtcctcgcc gacaccgaag cggccctgct gtcaccgac 480
accaccacg ccgccaccgc gggcgcctg gacacccccg ccctcaccgt cgacgaggac 540
accacggcgc gcgagcagga caccaccgcc ccggagctca ccgtgcggcc cgaccagctc 600
gcctacatca tgttcacctc cggtcgcacc ggcaccccca agggcatcgg catcaccac 660
cgcgacgcca tcgccctggc cgccgaccgc tgctgggacc tggacaccgg ctcccgcgtc 720

ES 2 447 491 T3

ctgatgcaact ccccgtagcg cttcgacatc tccaccttcg aactgttcgc cccgctgctg 780
 gccggcgggc ggatcgtegt cgcaccccg cggcagatcg acgcgcccg cctgcagcgc 840
 accctcggcg cccacggcgt cacctcgtg ctgctgaccg ccggcctgct cggcgtgatc 900
 gccgacgagg caccggagg cttcaccggc gtcaaggacg tgtggaccgg cggcgcgctc 960
 gtctctccca ccgccgtgcg ccgctcctc gaagcctgcc ccggcaccgt cgtcaagacc 1020
 ctctacgggc cgaccgagac caccctgggc tgacactggc tgccgttcac cgaccccg c 1080
 cgcaccccg ccgccgtccc catcgccgg ccgctggaca acacccgcgc ctacgtcctc 1140
 gacgaacggc tgcggcccg accgcccggc gtcaccggcg agctgtacat cggcggcgcc 1200
 ggctcgcgcc gcggctactg ggaccagagc gcccgaccg cggaacgctt caccgcccgc 1260
 ccgacgccc acctgttcgg cgacacgggc ggccgcatgt accgcaccgg cgacctggcc 1320
 cgccgcgacg ccgacggcgt cctccacttc tgcggcccg ccgaccagca ggtaagatc 1380
 cgcggcttcc gcatcgaacc cggcgagatc gagaccgcgc tcgcccca cccgacgctc 1440
 acccgcccg ccgctcgtgc ccgcccggc cgggcccggc acaaggctct cgtcgcctac 1500
 ctctcaccg ccccgacgc gggcgacacc accgcccgaac aactgcgcgc cggcctcgag 1560
 acccaactgc ccgactacat ggtccccgc gcgttcgtcg cgtgcccgc cctgcccgtc 1620
 acgccaacg gcaaactcga ccgcgacgca ctgcccgaac ccgactggg cggcggcgcc 1680
 ggacgcccgc cccgcgccc ccgcgaggaa atcctgtgcg gcctgttcgc cgaggtcctc 1740
 ggcgcccccc gggctggcac cgacgacaac ttcttcgaac tcggcgcca ctccatgctc 1800
 gccacccgcc tcgtcggcg cgtcaagacc gtccctcggc ccgacatcgg cgtacgcacc 1860
 ctcttcgagg cgccgaccgt cgccgccctc gcccccga tcgacggcgc cgacgggccc 1920
 tccgtgccg aggccgaagc ggtgccgccc tacggtccc ccccgctgac ccccgatg 1980
 gcccgatcg ccgaactgg cctgggggga gacgacttca accagtcgg cgtggtgtcc 2040
 ctgccgccc cgggtgaccg ggaccggctc gtcccggccc tgcaacgtgt gctcgaccac 2100
 catgacgcgc tgcgcctg cgtcctgccc gacgggagca cggaggtacg cgccccggc 2160
 agtgtgccg ccgcgacgt cctgagcgtc gtcacgcgg cccccggc caccggcgag 2220
 gcgcgcgacg ccctgctcgt ggaggcggc tgcgccgac gggaccgct cgacccggcc 2280
 gagggccga tgctccaggc ggtcctggtc gacggcacgg acgacacgga cggcacggc 2340
 gggacctcc gggcgacgg cgtgctgatc ctggctgcc accacctgg ggtcgactcg 2400
 gtgacgtgga gcatcgtcgt accggacctc gcccgccct accggggcga ggagcccgc 2460
 ccggtgggca cctcgtggc gcagtggcc acctccctg cacggtggc caccgacccc 2520
 cgcgtcagg cggagaccgc cactgggag cacacgctca ccggggcgg caccctgcgg 2580
 ctggaccgc gccgcatct ccaggcgac gccggacgca tcagcctcga cctggccccg 2640
 cacacgacc aggcctgct cacgcgctg cccggggcg tcaacgcgag cgtgcacgac 2700
 gtctctgta ccgctctgc gttcggcgt gccgggtgg ggcgcggac cggcgaggac 2760
 ccggacgcgc ccgctcgtc cgacctggag agccacggcc ggcacgagga ggcggtgccc 2820

ES 2 447 491 T3

ggcgccgaac tcagccgcac ggcgggctgg ttcacggccc tccaccgggt gcggtggct 2880
 ccggacgtca ccgactgggc gcggtgcac caggacggcg acgcgctccg ggacggcctc 2940
 aagcaggtga aggaacagtt gcggtccgta ccgggcgacg gcctcggcca cggcttgctg 3000
 cgccacctca accccaccgc tgggccccgc ctcgcacgcc ttcccagacc cgacttcggc 3060
 ttcaactacc tgggccgccc ggtcaccgcc gccaccggca ccccggaacc gtggaccgtc 3120
 acgggcggcg gcctcggcgc ctcgaggccc acggcgccga tggcccacgc ggtggagctg 3180
 agcgcctcg tccacgaggg ggcggacggc ccccgactgc gcgcggagtg gacctacga 3240
 cgccgcctgg tccccgatca cgacgcccgc cgcctggccc agcaatggtt ccgggcgctg 3300
 gaagccctgg tggagcaggc cgaccgggcc ggcaccggcg gcctgacccc gtccgacgtg 3360
 accctcggct cgctcagcca gtccgagatc gaggaattcg agtccgacct tgagtccgag 3420
 tggttaatta attgaa 3436

<210> 6
 <211> 1087
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia híbrida

<400> 6

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

ES 2 447 491 T3

Val Met Thr Asn His His Ile Val Leu Asp Gly Trp Ser Met Pro Val
 145 150 155 160
 Leu Leu Arg Glu Leu Met Ala Leu Tyr Ala Ala Glu Gly Asp Pro Ser
 165 170 175
 Ala Leu Pro Arg Val Arg Pro Tyr Arg Asp Tyr Leu Ala Trp Leu Asp
 180 185 190
 Ala Arg Asp Arg Asp Ala Ala Arg Asp Ala Trp Arg Arg Ser Leu Ser
 195 200 205
 Gly Leu Asp Glu Ala Thr Leu Leu Ala Pro Asp Ala Gly Pro Ala Ser
 210 215 220
 Thr Ala Pro Ser Gln Val Ser Phe Thr Val Asp Ser Glu Val Ser Gly
 225 230 235 240
 Ala Leu Ser Ala Trp Ala Arg Gly Gln Gly Val Thr Met Asn Thr Val
 245 250 255
 Val Gln Gly Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Gln Ala Thr Gly Arg Asp
 260 265 270
 Asp Val Val Phe Gly Ala Thr Val Ser Gly Arg Pro Pro Glu Leu Pro
 275 280 285
 Gly Val Glu Ser Met Ile Gly Leu Phe Ile Asn Thr Leu Pro Val Arg
 290 295 300
 Ala Arg Leu Asp Gln Ala Glu Pro Leu Gly Asp Leu Phe Arg Arg Leu
 305 310 315 320
 Gln Asn Glu Gln Ala Arg Leu Leu Asp His Gln Trp Pro Gly Leu Ala
 325 330 335
 Asp Ile Gln His Trp Ala Gly His Gly Glu Leu Phe Asp Thr Ala Met
 340 345 350
 Val Phe Gln Asn Tyr Pro Val Glu Glu Gly Asp Leu Thr Ala Pro Ala
 355 360 365
 Asp Pro Asp Arg Leu Arg Val Ala Ser Ala Asp Ile Lys Gly Gly Thr
 370 375 380
 His Phe Ala Val Asn Val Val Ala Thr Met Arg Gly Ala Glu Leu Ser
 385 390 395 400
 Phe Arg Val Asp Tyr Arg Pro Asp Leu Tyr Asp Glu Ala Tyr Ala Arg
 405 410 415

ES 2 447 491 T3

Asp Phe Gly Arg Arg Met Leu Arg Val Leu Glu Thr Leu Ile Ser Asp
 420 425 430
 Pro Asp Arg Pro Val Ala His Leu Asp Thr Leu Asp Pro Ala Val Arg
 435 440 445
 Glu Arg Val Leu Val Glu Trp Asn Gly Ala Pro Thr Gln Leu Pro Gly
 450 455 460
 Thr Pro Leu His Glu Leu Thr Ser Leu Ile Ser Pro Ser Met Arg Ala
 465 470 475 480
 Arg Phe Asp Ser Trp Asn Glu Thr Ala Glu Glu Phe Pro Ala Asp Lys
 485 490 495
 Thr Leu His Ala Val Phe Glu Glu Met Ala Glu Arg Trp Pro Asp Glu
 500 505 510
 Ile Ala Val Val Tyr Arg Glu Asn Arg Leu Thr Tyr Arg Glu Leu Asn
 515 520 525
 Glu Arg Ala Asn Arg Leu Ala His Tyr Leu Arg Ser Val Val Glu Leu
 530 535 540
 Arg Pro Asp Asp Leu Val Ala Leu Val Leu Asp Lys Ser Glu Leu Met
 545 550 555 560
 Ile Thr Ala Ile Ile Ala Ala Trp Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Val Pro
 565 570 575
 Ile Asp Ser Gly Tyr Pro Asp Asp Arg Ile Ser Phe Met Leu Ser Asp
 580 585 590
 Thr Ala Ala Arg Val Val Val Thr Asn Glu Ile His Ser Asp Arg Leu
 595 600 605
 Arg Ser Leu Ala Glu Thr Gly Thr Pro Val Leu Glu Ile Glu Leu Leu
 610 615 620
 His Leu Asp Asp Gln Pro Ala Val Asn Pro Val Thr Glu Thr Thr Ser
 625 630 635 640
 Thr Asp Leu Ala Tyr Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Thr Thr Gly Lys Pro
 645 650 655
 Lys Ala Val Leu Val Glu His Arg Gly Val Val Asn Leu Gln Val Ser
 660 665 670
 Leu Ala Lys Leu Phe Gly Leu Asp Lys Ala His Arg Asp Glu Ala Leu
 675 680 685
 Leu Ser Phe Ser Asn Tyr Ile Phe Asp His Phe Val Glu Gln Met Thr

ES 2 447 491 T3

690						695										700
Asp	Ala	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	Lys	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Gly	Ser	Met	
705					710					715					720	
Arg	Thr	Asp	Pro	Gly	Arg	Leu	Cys	Arg	Tyr	Met	Asn	Asp	Glu	Gln	Val	
				725					730					735		
Thr	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Ser	
			740					745					750			
Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Arg	Ile	Asp	Ala	Ile	Gly	Glu	Asp	Phe	Thr	
		755					760					765				
Glu	Pro	Val	Phe	Ala	Lys	Ile	Arg	Gly	Thr	Phe	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	
	770					775					780					
Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Thr	Glu	Ile	Ser	Ile	Thr	Ser	His	Lys	Arg	Pro	
785					790					795					800	
Tyr	Pro	Pro	Asp	Val	His	Arg	Val	Asn	Lys	Ser	Ile	Gly	Phe	Pro	Val	
				805					810					815		
Ala	Asn	Thr	Lys	Cys	His	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Met	Lys	Pro	Val	Pro	
			820					825					830			
Val	Gly	Gly	Ile	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Val	Thr	Arg	
		835					840					845				
Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg	Phe	Val	Glu	Asn	
	850					855					860					
Pro	Phe	Gln	Thr	Ala	Glu	Glu	Arg	Arg	Leu	Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Leu	
865					870					875					880	
Tyr	Lys	Thr	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Trp	Leu	Pro	Asn	Gly	Glu	Val	Glu	
				885					890					895		
Tyr	Leu	Gly	Arg	Thr	Asp	Leu	Gln	Val	Lys	Ile	Arg	Gly	Gln	Arg	Val	
			900					905					910			
Glu	Leu	Gly	Glu	Val	Glu	Ala	Ala	Leu	Ser	Ser	Tyr	Pro	Gly	Val	Val	
		915					920					925				
Arg	Ser	Leu	Val	Val	Ala	Arg	Glu	His	Ala	Val	Gly	Gln	Lys	Tyr	Leu	
	930					935					940					
Val	Gly	Phe	Tyr	Val	Gly	Glu	Gln	Glu	Phe	Asp	Glu	Gln	Asp	Leu	Lys	
945					950					955					960	
Gln	Trp	Met	Arg	Lys	Lys	Leu	Pro	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ala	Arg	Val	
				965					970					975		

ES 2 447 491 T3

Leu Arg Ile Thr Asp Ile Pro Val Thr Pro Ser Gly Lys Leu Asp Ala
 980 985 990

Arg Arg Leu Pro Glu Thr Asp Phe Gly Ala Gly Glu Gly Ala Glu Tyr
 995 1000 1005

Val Ala Pro Val Ser Glu Phe Glu Leu Lys Leu Cys Gly Ile Trp
 1010 1015 1020

Ala Gln Val Leu Glu Ile Ala Pro Asp Arg Ile Gly Val His Asp
 1025 1030 1035

Asp Phe Phe Ala Leu Gly Gly Asp Ser Ile Arg Ala Met Ala Leu
 1040 1045 1050

Ala Gln Ala Ile Thr Thr Gly Phe Gly Gln Gly Leu Gly Val Ala
 1055 1060 1065

Thr Val Leu Gln His Thr Thr Leu Ala Ala Gln Ala Glu His Ile
 1070 1075 1080

Gln Ala Ala Ala
 1085

- <210> 7
- <211> 3263
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia híbrida

- <400> 7

```

agccagcaac cgaccctgac gcgcggcaag atcgaggaca tccttccgct ctccccgctg      60
caagagggct tcgtgttct cgggctgctg cacaccgagg ggcccacact ctacatcggc      120
caggtggcct tcgacctgga gggccccttc gacggcgccc ggatgcgcga ggcggcccgg      180
gcgctgctgc gccggcacgc caacctgctg gccgggttcc ggcagcgcga gaacggggcc      240
tgggcccaac tggctctgcg cgacgtcgac ctgccgtggc aggacgccga cctgagcacg      300
ctgtccgagg aggagcggc ggcggaggcc gaccggctcg cggccgccga ccgtgcccgc      360
cgtttcgacc tgggccggcc cccgctgctg cgcttcaccg ccatccggct gtccgcccgc      420
cgcgctccgc tggatgatgac caaccaccac atcgtgctgg acggctggtc catgcccgtc      480
ctgctgctgc aactcatggc gctctacgcc gccgagggtg acccctccgc gctccccggg      540
gtccgtccct accgcgacta cctggcctgg ctcgacgccc ggcaccggga cgccgcccgc      600
gacgctggc ggcggctcct gtccgggctc gacgaggcca cctcctcgc cccggacgcc      660
ggcccggcgt cgaccgctcc ctcgcaggtg tccttcaccg tggactccga ggtcagcggc      720
gccctgtcgg cctgggctcg gggccagggc gtgaccatga acacgggtgt ccagggtgcc      780
    
```

ES 2 447 491 T3

tggggccctcg cgctggccca ggccaccgga cgcgacgacg tcgtcttcgg cgccaccgtc 840
 tccggccgcc cgcccagact gcccgcgctc gagtccatga tcggcctggt catcaacacc 900
 ctgcccgtcc gcgcccgcct cgaccaggcc gaaccctcgc gcgacctctt ccgcccgcctc 960
 cagaacgaac aggcccgcct cctggaccac cagtggcccc gactcgccga catccagcac 1020
 tggggccggac acggcgaact cttcgacacc gccatggtct tccagaacta cccggctcag 1080
 gagggcgacc tcaccgcccc cgccgaccgg gaccggctcc gggtcgcctc ggccgacatc 1140
 aagggcgcca cgcaactcgc cgtcaacgct gtcgcgacga tgcgcgggcg cgaactgtcc 1200
 ttccgctcgc actaccgacc cgacctctac gacgaggcgt acgcccgcga ctccggccga 1260
 cggatgctac gggactgga aaccctgatc tccgaccggg accgtcccgt ggccccactg 1320
 gacaccctcg acccgccgt acgggagcgg gtcctggtgg agtggaacgg ggccccgacc 1380
 cagcttcccg gaacgccgct gcacgaactg actagtctca tctcaccgtc gatgcgcgcg 1440
 cggttcgatt cgtggaacga gaccgccgag gaattccccg cggacaagac gctgcacgcg 1500
 gtgttcgagg agatggccga gcgctggccg gacgagatcg ccgtggtgta ccgggaaaac 1560
 cggctgacct acccgagact gaacgagcgg gcccaaccgc tcgcgacta cctgcgctcg 1620
 gtggtcgaac tgcgcccgga cgacctcgtc gcgctggtgc tggacaagag cgaactgatg 1680
 atcaccgca tcacgcggc gtggaagacc ggtgcggcct acgtgccgat cgactccggc 1740
 taccgggacg accggatctc gttcatgctc tccgacaccg ccgcgcgctt ggtggtgacc 1800
 aacgagatcc acagcgaccg gctgcttcg ctggcggaga ccggcacgcc cgtgctggag 1860
 atcgaactgc tgcacctga cgaccagccg gcggtgaacc cggtcaccga gaccaccagc 1920
 accgacctc cctacgcgat ctacacctc ggcaccaccg gcaagccaa ggcggtgctt 1980
 gtcgaacacc gcggcgtggt caacctccag gtgtcgtcgg cgaagctggt cggctctggac 2040
 aaggcgcacc gcgacgaggc gctgctgtcg ttctcgaact acatcttca ccactctcgc 2100
 gagcagatga ccgacgcgct gctcaacggg cagaagctgg tgggtgctga cggcagcatg 2160
 cgcaccgatc ccgggcgcct gtgcccgtac atgaacgacg agcagggtac ctacctctcg 2220
 ggcacgccgt cgggtgctctc gctctacgac tactcgtcgg cgacctcgtc gaccggatc 2280
 gacgcgatcg gcgaggactt caccgagccg gtgttcgcca agatccgcg caccttcccc 2340
 ggcctgatca tcaacggcta cgggcccagc gaaatctca tcaccagcca caaacggccc 2400
 taccgccgg acgtgcaccg ggtgaacaag agcatcggt tcccggctgc caacaccaag 2460
 tgccacgtgc tgaacaaggc gatgaagccg gtcccggctc gcggtatcgg cgagctctac 2520
 atcggcggca tcggcgtgac caggggttac ctcaaccgcg aggacctgac cgccgaccgg 2580
 ttctgtggaga acccgttcca gaccgcggag gaacggcggc tgggagagaa cggccgcctg 2640
 tacaagaccg gcgacctggt gcgctggctg cccaacggcg aggtggagta cctcgccgc 2700
 accgacctgc aggtcaagat ccgcccagc gcgctggaac tcggcgaggt ggaggcggcg 2760
 ctgtcgtcct accccggggt ggtgcgctcg ctggtcgtgg cccgagagca cgcggtgggg 2820
 cagaagtacc tggtcggggt ctacgtcggc gagcaggagt tcgacgagca ggacctcaag 2880

ES 2 447 491 T3

cagtggatgc gcaagaagtt gcccgagtcg gtggtgcccg cgcgcgtcct gcggatcacc 2940
gacatcccgg tgaccccagag cggcaagctg gacgcgcggc gcctgcccga gacggacttc 3000
ggggccggtg agggcgccga atacgtcgcg ccggtcagcg agttcgagct gaagctgtgc 3060
ggtatctggg cccaggtgct ggagatcgcg ccggaccgca tcggcgtgca cgacgacttc 3120
ttcgcgctcg gcggcgacag catccgcgcg atggcgctcg cgcaggcgat caccaccggc 3180
ttcggccagg gcctcgggtg ggcgaccgtg ctccagcaca ccacgctcgc cgcccaggcc 3240
gagcacatcc aggcggccgc gct 3263

<210> 8
<211> 1095
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia híbrida

<400> 8

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

ES 2 447 491 T3

His His Ile Leu Met Asp Gly Trp Cys Leu Pro Leu Ile Thr Lys Glu
 180 185 190
 Val Phe Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Glu Arg Arg Gln Pro Glu Arg
 195 200 205
 Glu Ala Val Thr Pro Tyr Ser Arg Tyr Ile Glu Trp Leu Glu Asp Gln
 210 215 220
 Asp His Gln Asn Ala Leu Ala Tyr Trp Gln Lys Tyr Leu Asp Gly Tyr
 225 230 235 240
 Glu Gly Gln Thr Val Leu Leu Lys Glu Pro Val Ser Asn Gln Ala Lys
 245 250 255
 Gly Tyr Gln Lys Gln Arg Leu Ala Cys Arg Leu Gly Lys Gln Leu Ser
 260 265 270
 Glu Glu Ile Arg Gln Thr Ala Ser Lys His His Val Thr Val Asn Thr
 275 280 285
 Phe Ile Gln Ser Ala Trp Gly Leu Leu Leu Gln Arg Tyr Asn Asn Ser
 290 295 300
 Gln Asp Val Val Phe Gly Ser Val Val Ser Gly Arg Pro Ala Glu Ile
 305 310 315 320
 Pro Gly Ile Glu Ser Met Val Gly Leu Phe Ile Asn Thr Ile Pro Val
 325 330 335
 Arg Ile Thr Ala Gln Pro Gly Met Thr Val Glu Gln Val Leu Lys Met
 340 345 350
 Ser Gln Glu Gln Ala Leu Ala Ser Gln Ala Tyr Asp Thr Phe Pro Leu
 355 360 365
 Tyr Glu Ile Gln Ala Gln Thr Glu Gln Lys Gln Gln Leu Ile Ser His
 370 375 380
 Ile Met Val Phe Glu Asn Tyr Pro Val Glu Lys Gln Met Glu His Met
 385 390 395 400
 Lys Pro Asn Arg Asp Ala Leu Asp Ile Ile Asn Phe His Met Glu Glu
 405 410 415
 His Thr His Tyr Asp Phe Asn Phe Ile Val Met Pro Ala Gly Glu Ile
 420 425 430
 Asp Ile His Phe Val Tyr Asn Ser Asn Val Tyr Asp His Ala Ser Val
 435 440 445

ES 2 447 491 T3

Lys Arg Met Glu Glu His Phe Met Gln Ile Ile Lys Gln Met Val Asn
 450 455 460
 Ser Gln Ala Ile Arg Val Gln Asp Leu Asp Ile Leu Thr Gly Thr Ser
 465 470 475 480
 Leu Ile Ser Pro Ser Met Arg Ala Arg Phe Asp Ser Trp Asn Glu Thr
 485 490 495
 Ala Glu Glu Phe Pro Ala Asp Lys Thr Leu His Ala Val Phe Glu Glu
 500 505 510
 Met Ala Glu Arg Trp Pro Asp Glu Ile Ala Val Val Tyr Arg Glu Asn
 515 520 525
 Arg Leu Thr Tyr Arg Glu Leu Asn Glu Arg Ala Asn Arg Leu Ala His
 530 535 540
 Tyr Leu Arg Ser Val Val Glu Leu Arg Pro Asp Asp Leu Val Ala Leu
 545 550 555 560
 Val Leu Asp Lys Ser Glu Leu Met Ile Thr Ala Ile Ile Ala Ala Trp
 565 570 575
 Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Val Pro Ile Asp Ser Gly Tyr Pro Asp Asp
 580 585 590
 Arg Ile Ser Phe Met Leu Ser Asp Thr Ala Ala Arg Val Val Val Thr
 595 600 605
 Asn Glu Ile His Ser Asp Arg Leu Arg Ser Leu Ala Glu Thr Gly Thr
 610 615 620
 Pro Val Leu Glu Ile Glu Leu Leu His Leu Asp Asp Gln Pro Ala Val
 625 630 635 640
 Asn Pro Val Thr Glu Thr Thr Ser Thr Asp Leu Ala Tyr Ala Ile Tyr
 645 650 655
 Thr Ser Gly Thr Thr Gly Lys Pro Lys Ala Val Leu Val Glu His Arg
 660 665 670
 Gly Val Val Asn Leu Gln Val Ser Leu Ala Lys Leu Phe Gly Leu Asp
 675 680 685
 Lys Ala His Arg Asp Glu Ala Leu Leu Ser Phe Ser Asn Tyr Ile Phe
 690 695 700
 Asp His Phe Val Glu Gln Met Thr Asp Ala Leu Leu Asn Gly Gln Lys
 705 710 715 720
 Leu Val Val Leu Asp Gly Ser Met Arg Thr Asp Pro Gly Arg Leu Cys

ES 2 447 491 T3

725 730 735
 Arg Tyr Met Asn Asp Glu Gln Val Thr Tyr Leu Ser Gly Thr Pro Ser
 740 745 750
 Val Leu Ser Leu Tyr Asp Tyr Ser Ser Ala Thr Ser Leu Thr Arg Ile
 755 760 765
 Asp Ala Ile Gly Glu Asp Phe Thr Glu Pro Val Phe Ala Lys Ile Arg
 770 775 780
 Gly Thr Phe Pro Gly Leu Ile Ile Asn Gly Tyr Gly Pro Thr Glu Ile
 785 790 795 800
 Ser Ile Thr Ser His Lys Arg Pro Tyr Pro Pro Asp Val His Arg Val
 805 810 815
 Asn Lys Ser Ile Gly Phe Pro Val Ala Asn Thr Lys Cys His Val Leu
 820 825
 Asn Lys Ala Met Lys Pro Val Pro Val Gly Gly Ile Gly Glu Leu Tyr
 835 840 845
 Ile Gly Gly Ile Gly Val Thr Arg Gly Tyr Leu Asn Arg Glu Asp Leu
 850 855 860
 Thr Ala Asp Arg Phe Val Glu Asn Pro Phe Gln Thr Ala Glu Glu Arg
 865 870 875 880
 Arg Leu Gly Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg
 885 890 895
 Trp Leu Pro Asn Gly Glu Val Glu Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Leu Gln
 900 905 910
 Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val Glu Leu Gly Glu Val Glu Ala Ala
 915 920 925
 Leu Ser Ser Tyr Pro Gly Val Val Arg Ser Leu Val Val Ala Arg Glu
 930 935 940
 His Ala Val Gly Gln Lys Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Val Gly Glu Gln
 945 950 955 960
 Glu Phe Asp Glu Gln Asp Leu Lys Gln Trp Met Arg Lys Lys Leu Pro
 965 970 975
 Glu Ser Val Val Pro Ala Arg Val Leu Arg Ile Thr Asp Ile Pro Val
 980 985 990
 Thr Pro Ser Gly Lys Leu Asp Ala Arg Arg Leu Pro Glu Thr Asp Phe
 995 1000 1005

ES 2 447 491 T3

Gly Ala Gly Glu Gly Ala Glu Tyr Val Ala Pro Val Ser Glu Phe
 1010 1015 1020

Glu Leu Lys Leu Cys Gly Ile Trp Ala Gln Val Leu Glu Ile Ala
 1025 1030 1035

Pro Asp Arg Ile Gly Val His Asp Asp Phe Phe Ala Leu Gly Gly
 1040 1045 1050

Asp Ser Ile Arg Ala Met Ala Leu Ala Gln Ala Ile Thr Thr Gly
 1055 1060 1065

Phe Gly Gln Gly Leu Gly Val Ala Thr Val Leu Gln His Thr Thr
 1070 1075 1080

Leu Ala Ala Gln Ala Glu His Ile Gln Ala Ala Ala
 1085 1090 1095

<210> 9
 <211> 3287
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia híbrida

<400> 9

atcgaacatt ggcgagctca agaacacatt cacctgacgc caagcgatat ttcgctgaag 60
 gacataacaa tcgaggaatt agatcaatth gtaagcaaa cacagcatat cggcgacatt 120
 gaaaatatat atcctttaac tcccatgcag aaaggatgct tgttccatag ttaaatcga 180
 tcggcttcca gagcttactt tgaacaagcc gcttttgacc tcaaaggcga cttggatatt 240
 gaggcattta caatgagttt gtcgtatctg gcggaaagcc atgagattct cgggactcat 300
 ttttatacgg aatggaaaga tcagcctttg cagatcgtat tccgaaaaaa accgatcgaa 360
 ataaccgttg aagatattcg aagcatgaag aataaacaac gaaacgagtt cattgccggc 420
 tttgtacaaa aagataaggc aagaggattc gaccttacc aagatgcggt aatgcgcgta 480
 tcaatccttc gtacagagga cgaccaagtc cgattgatat ggagcttcca tcatatttta 540
 atggatggct ggtgtctgcc tcttattacg aaagaagtgt ttgaaaccta ttatgagctt 600
 cttgagagaa gacaaccgga gcggaagcc gtcaccccg acagccgata tatcgaatgg 660
 ctggaagacc aggatcatca gaacgctttg gcctattggc aaaaatattt ggacggttat 720
 gaaggacaaa ccgttttact gaaagaacct gtctcaaacc aagccaaggg atatcaaaaa 780
 caaaggcttg catgccggct cggaaagcag ctatcagaag aatcagaca gactgcaagc 840
 aagcatcacg tcaccgtgaa tacattcatt caaagtgcgt gggggctatt gctgcaaaga 900
 tacaacaaca gtcaggatgt cgttttcggg tcggttgtat ccggacgccc ggcagaaatt 960
 ccgggtattg aatccatggt cggcttattt atcaacacca ttcccgtacg tattaccgct 1020

ES 2 447 491 T3

cagcctgga tgactgtgga acaagtgttg aaaatgagcc aggagcaggc attggcttct 1080
 caggcgtatg atacatttcc gttgtatgaa attcaggctc aaaccgaaca aaagcagcag 1140
 ctgatcagtc atatcatggt atttgaaaat tatccggctc agaaacaaat ggagcatatg 1200
 aaaccgaatc gtgacgcgct ggacattatc aatttcata tggagagca taccattac 1260
 gatttcaatt tcattgtcat gccggctgga gaaatcgaca ttcattttgt atacaatagc 1320
 aacgtctatg atcatgcaag tgtcaagcgg atggaagagc attttatgca aatcattaag 1380
 cagatggtga acagtcaggc gattcgcgtc caagacttgg atatacttac gggaaactagt 1440
 ctcatctcac cgctgatgcg cgcgcggctc gattcgtgga acgagaccgc cgaggaattc 1500
 cccgcggaca agacgctgca cgcggtgttc gaggagatgg ccgagcgtg gccggacgag 1560
 atcgcctggtg tgtaccggga aaaccggtc acctaccgc agctgaacga gcgggccaac 1620
 cgctcgcgc actacctgcg ctggtgtgtc gaactgcgcc cggacgacct cgctcgcgctg 1680
 gtgctggaca agagcgaact gatgatcacc gcgatcatc cggcgtggaa gaccggtgcg 1740
 gcctacgtgc cgatcgactc cggctaccg gacgaccgga tctcgttcat gctctccgac 1800
 accgccgcg gcgtggtggt gaccaacgag atccacagcg accggtgcg ttcgctggcg 1860
 gagaccggca cgcccgtgct ggagatcgaa ctgctgcacc tcgacgacca gccggcggtg 1920
 aaccgggtca ccgagaccac cagcaccgac ctgcctacg cgatctacac ctccggcacc 1980
 accggcaagc ccaaggcggg gcttgtcgaa caccgcggcg tggtaacct ccaggtgctg 2040
 ctggcgaagc tgttcggtct ggacaaggcg caccgcgacg aggcgctgct gtcgttctcg 2100
 aactacatct tcgaccactt cgctgagcag atgaccgacg cgctgctcaa cgggcagaag 2160
 ctggtggtgc tcgacggcag catgcgcacc gatccccggc gcctgtgccg gtacatgaac 2220
 gacgagcag tcacctacct ctccggcagc ccgtcggctc tctcgtctta cgactactcg 2280
 tcggcgacct cgctgaccg gatcgacgcg atcggcgagg acttcaccga gccggtgttc 2340
 gccaatatcc gcggcacctt ccccgccctg atcatcaacg gctacgggcc gacggaaatc 2400
 tcgatcacca gccacaaacg gccctaccg ccggacgtc accgggtgaa caagagcatc 2460
 ggcttcccgg tcgccaacac caagtgccac gtgctgaaca aggcgatgaa gccggtcccg 2520
 gtcggcggtg tcggcgagct ctacatcggc ggcatcggcg tgaccagggg gtacctcaac 2580
 cgcgaggacc tgaccgccga ccggttcgty gagaacctgt tccagaccgc ggaggaacgg 2640
 cggctgggcy agaacggccg cctgtacaag accggcgacc tgggtcgcctg gctgcccac 2700
 ggcgaggtgg agtacctcgg ccgcaccgac ctgcaggtea agatcccggy ccagcgcgtg 2760
 gaactcggcy aggtggaggc ggcgctgtc tctaccccg gggtygtgcy ctcgctggtc 2820
 gtggcccag agcacgcggt ggggcagaag tacctggtc ggttctacgt cggcgagcag 2880
 gagttcgac agcaggacct caagcagtg atgccaaga agttgccga gtccgtggtg 2940
 cccgcgcgcy tctgcggat caccgacatc ccggtgacct cgagcggcaa gctggacgcy 3000
 cggcgcctgc cggagacgga cttcggggcc ggtgagggcy ccgaatacgt cgcgccggtc 3060
 agcgagttcg agctgaagct gtgcggtatc tgggccaggy tgctggagat cgcgccggac 3120

ES 2 447 491 T3

cgcatcggcg tgcacgacga cttcttcgcg ctcggcggcg acagcatccg cgcgatggcg 3180
 ctcgcgagg cgatcaccac cggcttcggc cagggcctcg gtgtggcgac cgtgctccag 3240
 cacaccacgc tcgccgcca ggccgagcac atccaggcgg ccgcgct 3287

- <210> 10
- <211> 1706
- <212> PRT
- <213> Nocardia lactamdurans
- <400> 10

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

ES 2 447 491 T3

Arg Gly Arg Glu Leu Glu Phe Glu Leu Asp Glu Arg Thr Thr Glu Ala
 225 230 235 240

Leu Arg Glu Leu Ala Arg Thr Ala Arg Val Ser Leu Tyr Ser Val Leu
 245 250 255

Leu Gly Ala Trp Cys Leu Met Leu Asn Met Tyr Thr Gly Gln His Asp
 260 265 270

Leu Val Val Gly Thr Pro Ser Ala Asn Arg Gly Arg Pro Glu Phe Asp
 275 280 285

Arg Ala Val Gly Phe Phe Ala Asn Leu Leu Ala Leu Arg Val Arg Val
 290 295 300

Asp Pro Ala Ala Thr Leu Pro Ala Tyr Val Arg Ser Val Gly Glu Ala
 305 310 315 320

Val Val Ala Ala Gln Val His Gly Glu Leu Pro Phe Glu Gln Leu Val
 325 330 335

Lys Glu Leu Lys Val Glu Lys Asp Pro Ser Arg His Pro Ile Leu Gln
 340 345 350

Leu Asn Phe Thr Leu Gln Asn Val Ser Asp His Thr Ser Ala Leu Thr
 355 360 365

Gly Tyr Gln Pro Asp Ser Gly Gly Trp Thr Thr Thr Lys Phe Asp Leu
 370 375 380

Ser Ala Thr Met Thr Glu Thr Ala Thr Gly Leu Ala Gly Asn Leu Thr
 385 390 395 400

Tyr Ala Ala Ser Leu Phe Asp Asp Thr Ser Ala Ser Gly Phe Ile Ala
 405 410 415

Thr Phe Lys His Val Leu Ala Glu Phe Ala Ser Ala Ala Ala Gln Thr
 420 425 430

Pro Ile Ala Gln Leu Thr Ala Leu Asp Glu Pro Gly Gln Ala Ala Leu
 435 440 445

Leu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Ala Ala Arg Arg Thr Arg Thr Leu His
 450 455 460

Ala Val Phe Glu Glu Val Ala Ala Thr Trp Pro Asp Arg Val Ala Val
 465 470 475 480

Val His Gly Asp Val Arg Leu Thr Tyr Arg Glu Leu Asn Glu Arg Ala
 485 490 495

ES 2 447 491 T3

Asn Arg Leu Ala His His Leu Arg Ser Val Ala Glu Pro Arg Ala Asp
 500 505 510
 Glu Leu Ile Ala Leu Val Leu Asp Lys Ser Glu Leu Thr Leu Val Ala
 515 520 525
 Ile Leu Ala Val Trp Lys Ala Gly Ala Ala Tyr Met Pro Ile Asp Pro
 530 535 540
 Ser Tyr Pro Asp Asp Arg Ile Ala Phe Met Leu Ser Asp Thr Gly Ala
 545 550 555 560
 Lys Leu Val Leu Ala Gly Glu Ala His Gly Ser Arg Val Arg Gly Leu
 565 570
 Thr Ser Gly Asp Val Leu Asp Leu Glu Gln Leu Asp Leu Thr Gly Glu
 580 585 590
 Pro Ala Glu Asn Pro Val Thr Glu Thr Thr Ser Thr Glu Leu Ala Tyr
 595 600 605
 Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Thr Thr Gly Lys Pro Lys Ala Val Leu Val
 610 615 620
 Ser His Gly Ser Val Asp Ser Phe Arg Ala Gln Leu Ser Gly Arg Tyr
 625 630 635 640
 Phe Gly Ser Pro Asp Glu Ser Ala Glu Ala Val Leu Phe Leu Ala Asn
 645 650 655
 Tyr Val Phe Asp Phe Ser Val Glu Gln Leu Ala Leu Ser Val Leu Gly
 660 665 670
 Gly His Lys Leu Leu Val Pro Pro Pro Ser Ala Ala Asp Asp Pro Ala
 675 680 685
 Phe Tyr Glu Leu Ala Asn Arg Glu Gly Leu Ser Tyr Leu Ser Gly Thr
 690 695 700
 Pro Thr Gln Val Glu Arg Phe Asp Leu Ala His Leu Ser His Leu Arg
 705 710 715 720
 Cys Val Leu Val Ala Gly Glu Ala Phe Gln Pro Gln His Phe Glu Lys
 725 730 735
 Met Arg Gly Glu Phe Ala Gly Pro Ile Leu Asn Ala Tyr Gly Thr Thr
 740 745 750
 Glu Thr Thr Val Tyr Asn Thr Val His Arg Phe Glu Pro Gly Asp Ala
 755 760 765

ES 2 447 491 T3

Tyr Arg Asn Thr Leu Gly Ala Pro Leu Gly Asn Thr Arg Leu Tyr Val
 770 775 780
 Leu Gly Asp Gly Met Lys Leu Leu Pro Thr Gly Ala Val Gly Glu Leu
 785 790 800
 Tyr Leu Ala Gly Asp Cys Val Thr Glu Gly Tyr Leu His Arg Pro Glu
 805 810 815
 Leu Thr Arg Glu Arg Phe Leu Pro Asn Pro Phe Ala Ala Glu Ser Gly
 820 825 830
 Arg Phe Pro Met Ile Tyr Arg Thr Gly Asp Val Val Arg Arg Gly Pro
 835 840 845
 Asp Gly Glu Leu Gln Tyr Leu Gly Arg Asn Asp Ala Gln Val Lys Ile
 850 855 860
 Asn Gly Leu Arg Ile Glu Pro Gly Glu Val Glu Ala Ala Leu Ala Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gly Val Arg Gln Cys Ala Val Val Ala Gly Ala Asp Pro Gln
 885 890 895
 Ala Pro Glu Arg Lys Arg Leu Val Gly Tyr Tyr Leu Pro Glu Pro Gly
 900 905 910
 Ala Ala Val Asp Glu Ala Asp Leu Phe Ala Ala Leu Arg Ala Gln Leu
 915 920 925
 Met Pro Ser Met Val Pro Ser Leu Leu Val Arg Leu Asp Arg Pro Leu
 930 935 940
 Pro Met Thr Ile Thr Gly Lys Leu Asp Val Asp Ala Leu Pro Ser Ala
 945 950 955 960
 Asp Phe Ser Pro Lys Arg Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Arg Asp Arg Val
 965 970 975
 Glu Ala Arg Leu Cys His Leu Trp Ser Ala Gln Leu Pro Gly Gly Thr
 980 985 990
 Val Gly Ile Asp Asp Asp Phe Phe Arg Cys Gly Gly Asp Ser Ile Ser
 995 1000 1005
 Ala Leu His Leu Ala Ser Gln Val Gln Arg Glu Ile Glu Arg Lys
 1010 1015 1020
 Val Ser Val Lys Tyr Leu Phe Asp His Pro Thr Val Arg Ser Phe
 1025 1030 1035
 Val Asp Asn Val Leu Ser Gly Leu Ala Glu Ser Ser Gly Asp Asp

ES 2 447 491 T3

1040		1045		1050
Glu Pro 1055	Glu Gln Gly Arg	Leu Thr Gly Glu Cys 1060	Pro Met Leu Pro 1065	
Ile Gln 1070	Glu Trp Phe Phe Ala 1075	Lys Pro Leu Ala 1080	Asp Arg His Arg 1085	
Trp Asn 1085	His Asn Phe Ala 1090	Ile Arg Thr Pro Pro 1095	Leu Asp Pro Gly 1100	
Glu Leu 1100	Arg Thr Ala Leu 1105	Asp Arg Leu Val Glu 1110	His His Asp Ala 1115	
Phe Arg 1115	Leu Arg Phe Pro 1120	Glu Ser Gly Gly Gln 1125	Val Tyr Ala Glu 1130	
Asp Ala 1130	Ala Pro Ile Thr 1135	Leu His Glu Leu Asp 1140	Val Arg Gly Leu 1145	
Ala Asp 1145	Ala Asp Leu Arg 1150	Gln Arg Leu Val Asp 1155	Trp Gln Arg Thr 1160	
Phe Asp 1160	Leu Ala Asn Gly 1165	Pro Thr Ala Cys Ala 1170	Ala Tyr Leu His 1175	
Gly Phe 1175	Asp Asp Gly Thr 1180	Ala Arg Val Trp Phe 1185	Ala Leu His His 1190	
Leu Val 1190	Val Asp Thr Val 1195	Ser Trp His Ile Leu 1200	Ala Gln Asp Leu 1205	
Glu Ile 1205	Leu Tyr Asn Gly 1210	Gly Asp Leu Gly Ala 1215	Lys Thr Gly Ser 1220	
Tyr Arg 1220	Gln Trp Ala Gln 1225	Ala Val Arg Asp Tyr 1230	Thr Pro Ala Glu 1235	
Gly Glu 1235	Arg Glu Phe Trp 1240	Ala Glu Thr Thr Arg 1245	Asp Met Glu Ser 1250	
Ala Glu 1250	Leu Leu Ala Gln 1255	Thr Glu Gly Thr Thr 1260	Arg Arg Arg Glu 1265	
Glu Phe 1265	Ala Leu Thr Ala 1270	Pro Asp Thr Arg Thr 1275	Leu Leu Ala Glu 1280	
Ser Pro 1280	Trp Ala Tyr Asp 1285	Thr Glu Val Asn Asp 1290	Leu Leu Leu Thr 1295	
Ala Thr 1295	Gly Ser Ala Leu 1300	Arg Ser Ile Thr Arg 1305	Gln Ala Thr Asn 1310	

ES 2 447 491 T3

His Leu Thr Val Glu Gly His Gly Arg Glu Leu Phe Glu Gly Ala
 1310 1315 1320

Pro Asp Val Arg Asp Thr Val Gly Trp Phe Thr Thr Met His Pro
 1325 1330 1335

Phe Ala Val Glu Val Asp Pro Gly Asp Leu Gly Arg Ser Val Leu
 1340 1345 1350

Ala Thr Arg Ala Asn Arg Arg Arg Val Pro His His Gly Ile Gly
 1355 1360 1365

Tyr Gly Ala Leu Phe Gly Gly Glu Ala Pro Leu Pro Ala Val Ser
 1370 1375 1380

Phe Asn Tyr Leu Gly Arg Leu Gly Glu Gly Asp Gly Gln Pro Thr
 1385 1390 1395

Glu Ala Trp Gln Leu Asp Pro Ala Leu Ser Gly Ser His Thr Val
 1400 1405 1410

Asp Gly Asn Arg Leu Ala Asn Arg Ser Ser Ile Asp Val Thr Met
 1415 1420 1425

Ser Cys Thr Gly Gly Arg Leu Val Ala Val Val Asp Ser Leu Leu
 1430 1435 1440

Gly Glu Ala Ala Thr Arg Leu Phe Ala Ser Glu Leu Lys Val Trp
 1445 1450 1455

Leu Glu Arg Leu Val Ser His Thr Ala Thr Val Ala Arg Asn Glu
 1460 1465 1470

Pro Ala Arg Glu Ala Thr Thr Glu Leu Phe Asp Pro Tyr Ile Leu
 1475 1480 1485

Val Asn Glu Asp Ala Glu Arg Thr Leu Phe Val Leu Pro Pro Gly
 1490 1495 1500

Glu Gly Gly Ala Glu Ser Tyr Leu Ser Asn Leu Ala Arg Gln Leu
 1505 1510 1515

Pro Asp Leu Arg Leu Val Leu Phe Asn Asn Val His Leu His Thr
 1520 1525 1530

Pro Met Gly Ser Phe Glu Glu Leu Gly Arg Tyr Tyr Val Glu His
 1535 1540 1545

Ile Arg Arg Leu Gln Pro Ser Gly Pro Tyr His Leu Leu Gly Trp
 1550 1555 1560

ES 2 447 491 T3

Ser Phe Gly Gly Val Leu Ser Leu Glu Ile Ser Arg Gln Leu Ala
 1565 1570 1575

Arg Ala Gly Glu Arg Ile Asp Asp Leu Leu Leu Ile Asp Pro Tyr
 1580 1585 1590

Phe Gly Met Arg Gln Ala Ser Ala Asn Ile Gly Leu Pro Gly Val
 1595 1600 1605

Glu Asp Ile Leu Asp Pro Ile Asn Tyr His Tyr Arg Pro Asp Glu
 1610 1615 1620

Ala Asp Leu Ala Arg Leu Ala Gly Arg Leu Gly Asn Leu Val Leu
 1625 1630 1635

Phe Lys Ala Gly Glu Pro Asn Asp Val Val Asn Gly Pro His Gln
 1640 1645 1650

Pro Arg Leu Phe Glu Tyr Tyr His Gly Thr Arg Phe Asn His Leu
 1655 1660 1665

Asp Leu Leu Leu Pro Ala Ala Ala Ile Glu Val Cys Asp Leu Ala
 1670 1675 1680

Gly Glu Thr His His Ser Trp Val Arg Asn Glu Lys Leu Val Arg
 1685 1690 1695

Leu Met Cys Glu Arg Ile Ser Thr
 1700 1705

- <210> 11
- <211> 5120
- <212> ADN
- <213> Nocardia lactamdurans

<400> 11

cgagcacacc gcgtggacgc cgccgcccac cgcggtcgag caccgcccgg tctcgctggc	60
gcaggaacgc ctgctgttca tcgacgactt cgaaggcggc acggcggcct acaacatccc	120
gttcgtgctc cggtgcccg cgcacaccg tgccgcgctc cccggtgcgc tgggcacgct	180
cgtgcgccgc caccggccc tgcgcacgct gctgaagacc gacgaccagg gcgtgcggcg	240
gcagtaccgg atccggcgg acgacgtccg gctcgaggtc ccgtcgacca cagtggacag	300
ccgggccgag ctggacgagg tgctgaccga gcgcgccggg tacgtgttcc ggctgcacga	360
ggaactgccc atccgcgccg aagcgttca ccacggcgac gagatctacc tcagcgtcgt	420
ggtgcaccac agctgcttcg acggctggtc gtgggacatc ttccgccgg agctggcggc	480
cctgctcgac ggcgtccccg aagccgatct cggcgcgctg cgcggcacct acggcgagtt	540
cgcgggtgtg cagcggcagt acctgaccgg caagcggctg gccgcgctga ccgagttctg	600
gaccggcggc ctggcggct tcgagaccat cgccctgccg ctggaccacc cgcgcccgcc	660

ES 2 447 491 T3

gcggttcgac taccgcgcc gcgagctgga gttcgagctg gacgagcgga ccaccgaggc 720
 gctgcgagag ctggccagga ccgccagggt gagcctctac agcgtgctgc tcggcgctg 780
 gtgcctgatg ctcaacatgt acaccgggca gcacgacctc gtggtcggca cgccgtcggc 840
 gaaccgaggc cgcccggagt tcgacagggc ggtcggcttc ttcggaacc tgctcgccct 900
 gcggttcgac gtcgaccggc ccgagacctc gccggcctac gtccggtcgg tcggcgaggc 960
 ggtggtggcc gcgaggtgc acggcgagct gccgttcgag cagctggtca aggaactcaa 1020
 ggtggagaag gacccgagcc gtcacccgat cctgcagctc aacttcaccc tgcagaacgt 1080
 ctccgaccac accagcgcgc tgaccgggta ccagccggac agcgggtggct ggaccaccac 1140
 caagttcgac ctgtccgga cgatgaccga gaccgagacc gggctggccg gcaacctgac 1200
 ctacgccgag tccctgttcg acgacaccag cgcgagcggg ttcacgcca cttcaagca 1260
 cgtgctggcc gagttcgctt cggccgcccgc gcagacccc atcgcccagc tcaccgctt 1320
 cgacgagccg gggcaggcgg cgtgctgac gccacccgcc gagcccgccg cccggcgagc 1380
 ccggacgctg cacgcggtct tcgaggaggt ggcggcgacc tggccggacc gggtcgccgt 1440
 ggtccacggt gacgtgcccg tgacctaccg cgaattgaac gagcgggcca accgcctcgc 1500
 ccaccacctg cggtcggtgg ccgaaccgag gcccgagcag ctgatcgcgc tgggtgctgga 1560
 caagtccgag ctgaccctcg tggcgatcct cgcggtgtgg aaggccgggg cggcgatcat 1620
 gccgatcgat ccgagctacc ccgacgaccg gatcgcgctc atgctgtccg acaccggcgc 1680
 gaaactggtg ctgcgcccgg aagcacacgg ctgcgcccgt cgcggcctga cctcgggcca 1740
 cgtgctcgac ctggaacagc tcgacctgac cggcgaacct gcggagaacc cggtcaccga 1800
 gaccaccagc accgaactgg cctacgcat ctacacctc ggcaccaccg gcaagcccaa 1860
 ggcggtgctc gtctgcacg gctcggctga cagcttccgc gcgagctga gcgggctga 1920
 cttcggctcg ccggacgagt ccgccgaagc cgtgttcttc ctggcgaact acgtgttcga 1980
 cttctccgtc gagcaactgg cgtgctcggg gctcggcggg cacaagctgc tcgtgccgcc 2040
 gccctcggcc gccgacgac cggcgcttca cgagctggcg aaccgagagg gtctgagcta 2100
 cctcagcggg actccgacgc aggtggagcg ctccgacctg gcgcacctga gccacctgcg 2160
 gtgcgtgctg gtcgcccggg aggcgcttca gccgcagcac ttcgagaaga tgccgcccga 2220
 gttcgcggg ccgacacctc acgcctaccg caccaccgaa accaccgtgt acaaccctg 2280
 gcaccgcttc gagcccggg acgcctaccg gaacacctc ggcgcccgc tgggcaacac 2340
 ccggctctac gtgctcggcg acgggatgaa gctgctgcc accggcgcg tcggcgagct 2400
 gtacctggcg ggcgactgcg tgaccgagg gtacctgac cggcccagc tgaccgagc 2460
 gcggttctc ccgaacctg tcgcccggga atccggccgg tccccgatga tctaccgac 2520
 cggggacgtg gtcgcccgcg gcccgagcgg cgaactccag tacctgggccc gcaacgacgc 2580
 ccaggatgag atcaacggcc tgccgatcga gcccgggcag gtcgaagcgg cactggcccg 2640
 ctgttccggc gtgcgcccag gcgcccgtc cgcgggcccg gacccgagc caccgagcg 2700
 caaacggctc gtcggctact acctgcccga gcccgggcgc gccgtggagc aagccgacct 2760

ES 2 447 491 T3

cttcgccgcg ctgcgggcgc agctgatgcc gagcatgggtg ccctcgctgc tggcgcggt 2820
 cgatcgcccc ctgccgatga cgatcaccgg caagctggac gtggatgcct tgcccagcgc 2880
 ggacttctcc ccgaagcggg cggcctacgc ggccccctgt gaccgggtgg aagcgcggt 2940
 gtgccacctg tggagcgcgc agctgccggg cggcacggtc ggcacgcagc acgacttctt 3000
 ccgctgcggt ggcgacagca tcagcgcgct gcacctggcg agccaggtgc agcgggagat 3060
 cgagcgcaag gtcagcgtca agtacctctt cgaccacccg accgtgcggt ccttcgtgga 3120
 caactgctc tccggcctcg ccgagagctc cggcgacgac gaacccgagc agggcaggct 3180
 gaccggcgag tgcccgatgc tgcccattca ggagtgggtc ttcgccaagc cgctggccga 3240
 ccggcaccgc tgaaccaca acttcgccat ccggaccccg ccgctggacc ccggcgagct 3300
 gcggaccgcg ctggaccggc tggctgagca ccacgacgcc ttccggctgc ggttcccgga 3360
 aagcggcggg caggtctacg ccgaggacgc cgcgccgatc accctgcacg agctcgacgt 3420
 gcgcggcctg gccgacgccg acctgcggca gcgcctggtc gactggcagc gcacctcga 3480
 cctggcgaac gggccgacgg cctgtgcggc ctacctgcac gggttcgacg acggcaccgc 3540
 acgggtctgg ttcgccctgc accacctcgt ggtggacacg gtgagctggc acatcctcgc 3600
 ccaggacctg gaaatcctgt acaacggcgg cgacctgggc gcgaagaccg gcagctaccg 3660
 gcagtgggcc caggcgggtc gcgactacac cccggccgag ggggagcgcg agttctgggc 3720
 ggagaccacc cgggacatgg agtccgcgga actgctggcg cagaccgaag gcaccaccag 3780
 gcgccgcgag gagttcgcgc tcaccgccc ggacacgcgg acgctgctgg cggagagccc 3840
 gtgggcctac gacaccgagg tcaacgacct gctgctgacc gcgaccggct ccgcgctgcg 3900
 gtcgatcacc cggcaggcga cgaaccacct caccgtcgag ggccacggcc gcgagctggt 3960
 cgagggcgcg ccggacgtgc gggacaccgt cggctgggtc accaccatgc acccgttcgc 4020
 cgctcaggtg gatcccggcg acctcggggc cagcgtgctc gccaccaggg cgaaccggcg 4080
 ccgggtgccg caccacggca tcggctacgg cgcgctcttc ggcgggtgag ccccgctgcc 4140
 ggcggtcagc ttcaactacc tcggcaggct gggcgagggg gacgggcagc cgaccgaggc 4200
 gtggcagctc gacccggcgt tgccggcag ccacaccgtc gacggcaacc gcctggcgaa 4260
 ccggtccagc atcgacgtga cgatgagctg caccggcggc cgcctggctg cgggtggtgga 4320
 cagcctgctc ggcgaagcgg ccacgcgctt gttccgacg gagctgaagg tgtggctgga 4380
 gcggtggctc tcgcacaccg cgaccgtcgc ccgcaacgaa ccggcacgcg aagccaccac 4440
 cgagctgttc gacccgtaca tcctggtcaa cgaggacgcc gagcgcacgc tcttcgtgct 4500
 gccgccgggc gaaggcggcg cggagagcta cctgagcaac ctcgcgcggc agttaccgga 4560
 cctgcggctc gtgctgttca acaacgtcca cctgcacacg cccatgggct cgttcgagga 4620
 actggggcgc tactacgtcg agcacatccg gcggctgcag ccgtccgggc cgtaccacct 4680
 gctcggctgg agcttcggcg gcgtgctgtc gctggagatc tcccggcagc tcgcgcgggc 4740
 gggggagcgg atcgacgacc tgctgctgat cgacccttac ttcgggatgc ggcaggcctc 4800

ES 2 447 491 T3

ggcgaacatc gggctgcccg gggctgagga catcctcgac cggatcaact accactaccg 4860
cccggacgag gccgacctcg cgcggctggc cgggcggtc gggaacctgg tgcgtttcaa 4920
ggccggtgag ccgaacgacg tggatgaacgg cccgcaccag ccccggttgt tcgagtacta 4980
ccacgggacg cgcttcaacc acctcgacct gctgctgcc gcggcccgga tcgaggtctg 5040
cgacctggcc ggggagacgc accactcgtg ggtgcgcaac gagaagctgg tgcggctgat 5100
gtgctgagcgg atttcgacga 5120

<210> 12
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 12

caccatggcg acgctgccgg aactgttc 28

<210> 13
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 13

tcaattaatt aaccactcgg actcaaggtc ggac 34

<210> 14
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 14

caccttaatt aatgaggaga atgcagcaac ggac 34

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 15

tcaatagcga gcgaggtgt c 21

<210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 16

caccactagt cgggagtac tctcatctat c 31

<210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 17

caccttaatt aatgccgaag aggtcaccac c 31

<210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 18

ggtcacgct ccctagg 17

<210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 19

caccactagt ctcatctcac cgtcgtatg 28

<210> 20
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 20

caccttaatt aataqccaqc aaccqaccq tqcq 34

ES 2 447 491 T3

<210> 21
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 21

ttactagtgt cgcgggcgta cgcctcgtc 29

<210> 22
<211> 1531
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia híbrida

<400> 22

ES 2 447 491 T3

ggtaattaa tatcgaacat tgcgcagctc aagaacacat tcacctgacg ccaagcgata 60
 tttcgctgaa ggacataaca atcgaggaat tagatcaatt tgtaagcaa acacagcata 120
 tcggcgacat tgaaaatata tatectttaa ctcccatgca gaaaggatg ctgttcata 180
 gtttaatcga ttcggcttcc agagcttact ttgaacaagc cgcttttgac ctcaaaggcg 240
 acttgatat tgaggcattt acaatgagtt tgtcgtatct ggcggaagc catgagattc 300
 tccggactca tttttatagc gaatggaaag atcagccttt gcagatcgta ttccgaaaaa 360
 aaccgatcga aataaccgtt gaagatattc gaagcatgaa gaataaaca cgaaacgagt 420
 tcattgccgg ctttgtaaca aaagataagg caagaggatt cgaccttacc caagatgcgt 480
 taatgcgcgt atcaatcctt cgtacagagg acgaccaagt ccgattgata tggagcttcc 540
 atcatatfff aatggatggc tgggtgtctgc ctcttattac gaaagaagtg tttgaaacct 600
 attatgagct tcttgagaga agacaaccgg agcgggaagc cgtcaccggt tacagccgat 660
 atatcgaatg gctggaagac caggatcatc agaacgcttt ggcttattgg caaaaatatt 720
 tggacgggta tgaaggacaa accgttttac tgaagaacc tgtctcaaac caagccaagg 780
 gatatcaaaa acaaaggctt gcatgccggc tcggaaagca gctatcagaa gaaatcagac 840
 agactgcaag caagcatcac gtcaccgtga atacattcat tcaaagtgcg tgggggctat 900
 tgctgcaaaag atacaacaac agtcaggatg tcgttttcgg gtcggttgta tccggacgcc 960
 cggcagaaat tccgggtatt gaatccatgg tcggcttatt tatcaacacc attcccgtac 1020
 gtattaccgc tcagcctgga atgactgtgg aacaagtgtt gaaaatgagc caggagcagg 1080
 cattggcttc tcaggcgtat gatactttc cgttgtatga aattcaggct caaacggaac 1140
 aaaagcagca gctgatcagt catatcatgg tatttgaaa ttatccggtc gagaaacaaa 1200
 tggagcatat gaaaccgaat cgtgacgcgc tggacattat caatttccat atggaagagc 1260
 ataccatta cgatttcaat ttcattgtca tgccggctgg agaaatcgac attcattttg 1320
 tatacaatag caacgtctat gatcatgcaa gtgtcaagcg gatggaagag ctttttatgc 1380
 aatcattaa gcagatggtg aacagtcagg cgattcgcgt ccaagacttg gatatactta 1440
 cgggagatga acgttcgctc cttatagagg catttaatga tacggaagca gattatccaa 1500
 aggaaaagac gcttcatcaa ttgactagta a 1531

<210> 23
 <211> 1909
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia híbrida

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (84)...(84)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (175)...(175)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (383)...(383)
<223> n es a, c, g o t

<400> 23

ES 2 447 491 T3

tcgagcggcc ggcgtattgg gtggttacgga gcattcacta ggcaaccatg catggttact 60
 attgtatacc atcttagtag gaantgattt cgaggtttat acctacgatg aatgtgtgtc 120
 ctgtaggctt gagagtca ggaagaaaca tgcaattatc tttgcaacc cagngctgg 180
 tgacggaatt ttcatagtca agctatcaga gtaaagaaga ggagcatgtc aaagtacaat 240
 tagagacaaa tatatagtcg cgtggagcca agagcggatt cctcagtctc gtaggtctct 300
 tgacgaccgt tgatctgctt gatctcgtct cccgaaaatg aaaatagctc tgctaagcta 360
 ttcttctctt cgccggagcc tгнаaggcgt tactaggttg cagtcaatgc attaatgcat 420
 tgacagatgag ctgtatctgg aagaggtaaa cccgaaaacg cgttttattc ttgttgacat 480
 ggagctatta aatcactaga aggcactctt tgctgcttgg acaaatgaac gtatcttctc 540
 gagatcctga acaccatttg tctcaactcc ggagctgaca tcgacaccaa cgatcttata 600
 tccagattcg tcaagctggt tgatgatttc agtaacgtta agtggatctc aagctcctgg 660
 gaccctggtg cgcctgctgg accggcgtg ttggtcggcg tcggtcagtc ctgctcctcg 720
 gccacgaagt gcacgcagtt gccggccggg tcgctcaggg cgaactccc ccccccacggc 780
 tgctcgcgga tctcggctcat ggccggcccg gaggcgtccc ggaagttcgt ggacacgacc 840
 tccgaccact cggcgtacag ctctgcccagg ccgctcacc acaccaggc caggggtgtg 900
 tccggcacca cctggtcctg gaccgcctg atgaacaggg tcacgtcgtc ccggaccaca 960
 ccggcgaagt cgtctccac gaagtcccg gagaaccga gccggtcggt ccagaactcg 1020
 accgctccgg cgacgtcgcg cgcggtgagc accggaacgg cactggtcaa cttggccatg 1080
 gtgatgtctg ctcaagcggg gtatctgcta gtcaagctgc gatgaagtgg gaaagctcga 1140
 actgaaaggt tcaaaggaat aaggatggg aaggatggag tatggatgta gcaaagtact 1200
 tacttagggg aaataaaggt tcttgatgg gaagatgaat atactgaaga tgggaaaaga 1260
 aagagaaaag aaaagagcag ctggtgggga gagcaggaaa atatggcaac aaatggtgga 1320
 ctgacgcaac gacctgtca accccgccga cacaccggg gcacagacgg ggcaaagctg 1380
 cctaccaggg actgagggac ctacgaggt cgagtgcaga gcaccggatg ggtcactgctc 1440
 cagcttgtgt tcccgtctg cgcgctggc cagctcctga gcggccttc cggtttcata 1500
 caccgggcaa agcaggagag gcacgatatt tggacgccct acagatgccg gatgggcca 1560
 ttagggagct tacgcgccg gtactcgtc tacctacttc ggagaaggta ctatctcgtg 1620
 aatcttttac cagatcggaa gcaattggac ttctgtacct aggttaatgg catgctattt 1680

 cgccgacggc tatacacccc tggcttcaca ttctctctc cttactgccg gtgattcgat 1740
 gaagctccat attctccgat gatgcaatag attcttggtc aacgagggc acaccagcct 1800
 ttccactctg gggcggaggg gcggccggtc ccggattaat aatcatccac tgcacctcag 1860
 agccgccaga gctgtctgga agcttctgca gacgcgtcga cgtcatatg 1909

<210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 24
 ttatcgatt gcataaaaaa cagac 25

<210> 25
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 25
 ttatgatgc ttacctcaa gcttcg 26

<210> 26
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 26
 gcctggtgcc tgatgc 16

<210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 27
 ggtgtggtcg gagacg 16

<210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 28
 caggaggaat tacatatgca gaatttcgag 30

<210> 29
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 29

cggccagggg tgcatacgtc atogccgagc 30

<210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 30

caggaggaat tacatacgcc gcccagtgac 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 31

gaattcccat atgcatccag gtcacggcc 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 32

caggaggaat tacatatgac caccaccacc 30

<210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 33

fcccatatgc atcctcaacc gttagaagcc 30

<210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 34

gtgaggtaac atatgagcca gaatctcttt 30

<210> 35
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 35

gtaatcaatg catcaactcat gcgtgtgttc 30

<210> 36
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 36

caggaggaat tacatatgtc taittatagc 30

<210> 37
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 37

gtcctcggtc tcatgcatct cgagttagcc caggaggt 38

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para la preparación de un antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o un antibiótico de N- α -amino-fenilacetil- β -lactama, que comprende poner en contacto un tripéptido hidroxifenilglicil-cisteinil-valina (HpgCV) o un tripéptido fenilglicil-cisteinil-valina (PgCV) con una IPNS para efectuar la formación del antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o el antibiótico de N- α -amino-fenilacetil- β -lactama, y en el que la IPNS tiene un grado de identidad de al menos 50% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y, cuando está alineada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, contiene una arginina, lisina o histidina en la posición 185 y, opcionalmente, una modificación en al menos una de las posiciones 91, 104, 183, 190, 321, 324, 325, 331, utilizando la numeración de posiciones de SEQ ID NO: 1.
- 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tripéptido HpgCV o el tripéptido PgCV se prepara poniendo en contacto los aminoácidos hidroxifenilglicina (Hpg) o fenilglicina (Pg), cisteína (C) y valina (V) con un péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) para efectuar la formación del tripéptido HpgCV o del tripéptido PgCV, comprendiendo la NRPS un primer módulo M1 específico para Hpg o Pg, un segundo módulo M2 específico para C y un tercer módulo M3 específico para V.
- 3.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la hidroxifenilglicil-cisteinil-valina es DLD-*p*-hidroxifenilglicil-cisteinil-valina y el antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama es amoxicilina.
- 4.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la fenilglicil-cisteinil-valina es DLD-fenilglicil-cisteinil-valina y el antibiótico de N- α -aminofenilacetil- β -lactama es ampicilina.
- 5.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que IPNS efectúa la formación de un antibiótico de β -lactama penam, y el antibiótico de β -lactama penam se convierte adicionalmente en un antibiótico de β -lactama cefem.
- 6.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el antibiótico de β -lactama cefem es cefadroxil o cefalexina.
- 7.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se realiza *in vivo*.
- 8.- Una enzima IPNS variante que tiene un grado de identidad de al menos 50% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que, cuando está alineada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, contiene una arginina, lisina o histidina en la posición 185 y, opcionalmente, una modificación en al menos una de las posiciones 91, 104, 183, 190, 321, 324, 325, 331, utilizando la numeración de posiciones de SEQ ID NO: 1.
- 9.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el primer módulo M1 específico para Hpg se puede obtener a partir de una CDA sintetasa, una cloroerenomicina sintetasa y/o una complestatina sintetasa.
- 10.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el primer módulo M1 específico para Pg se puede obtener a partir de una pristinamicina sintetasa.
- 11.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el módulo M2 comprende un dominio $^D C_L$ que está fusionado a un dominio A que se puede obtener a partir del segundo módulo de una ACVS, en donde el dominio $^D C_L$ es heterólogo con respecto al dominio A.
- 12.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el dominio $^D C_L$ del módulo M2 se puede obtener a partir de la enzima que es la fuente del primer módulo M1.
- 13.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 11-12, en el que el dominio $^D C_L$ del módulo M2 es el dominio C del séptimo módulo de una CDA sintetasa.
- 14.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 11-13, en el que el dominio $^D C_L$ del módulo M2 es el dominio C del segundo módulo de una iturina sintetasa.
- 15.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los dominios A y T del módulo M2 y el módulo M3 completo se pueden obtener de una ACVS, preferiblemente una ACVS bacteriana o fúngica.

- 16.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de ADN que codifica la IPNS de la reivindicación 8.
- 5 17.- Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la reivindicación 16.
- 18.- El hospedador de la reivindicación 17, transformado adicionalmente con genes de la vía biosintética a los aminoácidos Hpg o Pg.
- 10 19.- El hospedador de la reivindicación 17 ó 18, que comprende la vía biosintética a los antibióticos de β -lactama, preferiblemente en donde los genes que codifican ACVS y/o IPNS están inactivados.
- 20.- Un procedimiento para la producción de un antibiótico de N- α -amino-hidroxifenilacetil- β -lactama o un antibiótico de N- α -amino-fenilacetil- β -lactama, que comprende cultivar el hospedador de una cualquiera de las reivindicaciones 17-19 bajo condiciones que conducen a la producción del antibiótico de β -lactama.
- 15 21.- El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el antibiótico de β -lactama es amoxicilina, ampicilina, cefadroxil o cefalexina.