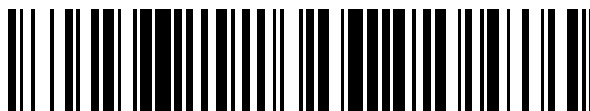


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 425**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/00** (2006.01)

**C12N 9/78** (2006.01)

**C12P 19/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2006 E 06835210 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 1960510**

54 Título: **Mutante de aminasa 5'-xmp específico de amoníaco**

30 Prioridad:

**14.12.2005 KR 20050123529**

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

**14.07.2014**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500 Namdaemunro 5-ga, Jung-gu  
Seoul 100-802 , KR**

72 Inventor/es:

**PAN, JAE-GU;  
JUNG, HEUNG-CHAE;  
KIM, EUI-JOONG;  
LEE, HAN-SEUNG;  
PARK, YOUNG HOON;  
KIM, HYOUNG SUK;  
HAN, JONG-KWON;  
LEE, JIN NAM;  
OH, KI-HOON;  
KIM, JEONG HWAN;  
OH, YOON-SUK;  
SIM, JAE ICK;  
HONG, KUK-KI;  
CHOI, KYUNG OH;  
KIM, HYUN SOO;  
BAEK, MIN-JI y  
KANG, TAE SUN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 476 425 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

Mutante de aminosasa 5'-xmp específico de amoníaco

**Campo técnico**

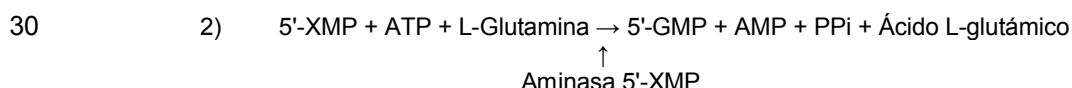
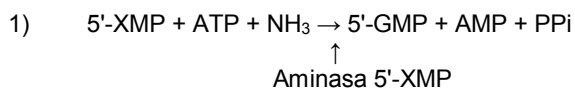
5 La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento de preparación de un mutante de aminosasa de ácido 5'-xantílico (XMP) que tiene una actividad potenciada, un mutante de aminosasa 5'-XMP preparado de acuerdo con el procedimiento, y un procedimiento para producir ácido 5'-guanílico (GMP) con eficacia potenciada y, más en particular, a un procedimiento de preparación de un mutante de aminosasa 5'-XMP específicamente reactivo para amoníaco, un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco preparado de acuerdo con el procedimiento, y un procedimiento de producción de 5'-GMP con alto rendimiento usando el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco.

10 **Técnica anterior**

El ácido 5'-guanílico (GMP) compite con al ácido 5'-inosínico (IMP) como el potenciador del sabor más ampliamente usado. El 5'-GMP es una de las sustancias responsables del gusto de las setas. Por sí solo, el 5'-GMP no tiene mucho gusto, pero su efecto es notable cuando se usa en combinación con 1-glutamato de monosodio (MSG). El 5'-GMP crea un efecto potenciador del sabor sinérgico en combinación con el 5'-IMP.

15 Son conocidos varios procedimientos para producir 5'-GMP, incluyendo: (1) la extracción de ARN de levadura y la digestión enzimática del mismo, (2) fermentación microbiana para la producción directa del mismo, (3) fermentación microbiana para formar guanosina, seguido de fosforilación química de guanosina, (4) fermentación microbiana para formar guanosina, seguido de fosforilación microbiana de guanosina, (5) fermentación microbiana para la producción de 5'-XMP, seguido de la conversión de 5'-XMP a 5'-GMP usando *Corynebacterium* spp, o (6) fermentación microbiana para la producción de 5'-XMP, seguido de la conversión de 5'-XMP a 5'-GMP por *E. coli*. De estos procedimientos, el procedimiento (1) tiene problemas relacionados con el suministro de material y la economía, y el procedimiento (2) sufre la desventaja de tener un bajo rendimiento de producción debido a que las membranas celulares son impermeables a 5'-GMP. Por estos motivos, en la industria se aplican típicamente los otros procedimientos.

25 In vivo, para la conversión de 5'-XMP a 5'-GMP, como en el caso de los procedimientos (5) y (6), la aminosasa 5'-XMP es la responsable, que cataliza las siguientes reacciones (Pantel et al. (1975), J. Biol. Sei., 250(7), 2609-2613).



35 La aminosasa 5'-XMP es un miembro de la superfamilia de glutamina amidotransferasas. Las glutamina amidotransferasas hidrolizan la glutamina en el grupo gamma-amida grupo para generar amoníaco. El amoníaco libre resultante se asimila en aminoácidos, nucleótidos, azúcares, coenzimas, y similares por medio de reacciones de polimerización. Las glutamina amidotransferasas tienen muchas sustancias objetivo diversas, pero el procedimiento por el que se hidroliza la glutamina para formar amoníaco se ha conservado bien durante la evolución. Las glutamina amidotransferasas se han dividido en dos subfamilias: clase I y clase II. Las enzimas de clase I incluyen antranilato sintasa, carbamoil fosfato sintetasa, CTP sintetasa, formilglicinamida sintetasa, ácido 5'-xantílico aminosasa, imidazol glicerol fosfato sintasa, aminodesoxicorismato sintasa, y p-aminobenzoato sintasa. Todas estas enzimas usan, además de glutamina, amoníaco externo como dador de amina (Cell Mol. Life Sei. 54, 205-222, 1998). A diferencia de cómo se transfiere el amoníaco, libre de glutamina, a un sustrato, se considera que el amoníaco externo se transfiere directamente a la transferasa.

45 En el contexto de la estructura de la proteína, la aminosasa 5'-XMP se puede separar en dos dominios bien definidos: uno que tiene actividad glutaminasa responsable de la hidrólisis catalítica de la glutamina y el otro dominio que tiene actividad transferasa (Nat. Str. Biol. 3(1), 74-86, 1996). El dominio N-terminal con actividad glutaminasa es estructuralmente similar a la carbamoil fosfato sintetasa, que ha sido bien estudiada. La actividad glutaminasa se logra principalmente por una tríada catalítica de residuos cisteína, histidina y glutamato, lo que es similar al mecanismo catalítico de la cisteína proteasa (Cell Mol. Life Sei. 54, 205-222, 1998). En particular, en *E. coli*, la cisteína 86, la histidina 181 y el ácido glutámico 183 forman una tríada catalítica. En el mecanismo enzimático de la glutaminasa, el residuo de cisteína catalítico forma un enlace tioéster gamma-glutamilo con glutamina, sirviendo la histidina como base para la hidrólisis de glutamina en ácido glutámico y amoníaco (Fukuyama et al. Biochemistry 3, 1448-1492, 1964; von der Saal et al. Biochemistry 24, 5343-5350, 1985). Por medio de un canal formado en la enzima, este amoníaco participa en la conversión del ácido 5'-xantílico en ácido 5'-guanílico (Raushel et al. Biochemistry, 38(25), 7891-7899, 1999).

La conversión catalizada por aminasa XMP de 5'-XMP en 5'-GMP usando amoníaco muestra el mismo mecanismo que el de la reacción usando L-glutamina, pero es ligeramente diferente en sus propiedades. La aminasa 5'-XMP, aunque es óptima a pH 8,3 para ambos sustratos, presenta dos o más veces como mucho actividad catalítica para la L-glutamina que para el amoníaco (Pantel et al. (1975), J. Biol. Sei., 250(7), 2609-2613). La diferencia se incrementa a medida que el pH de la reacción se aproxima al neutro, lo que implica que la aminasa 5'-XMP no emplea una fase de solución de amoníaco (NH<sub>3</sub>), pero se aprovecha de la L-glutamina en la conversión de 5'-XMP en 5'-GMP *in vivo*.

Cuando se trata con el reactivo sulfhidrilo reactivo con cisteína yodoacetamida o con el derivado de glutamina clorocetona o acivicina, la actividad de aminasa 5'-XMP disminuye con L-glutamina, pero permanece sin cambios con amoníaco, lo que indica que el residuo cisteína en el sitio activo de la glutaminasa es esencial para la actividad dependiente de glutamina de la aminasa 5'-XMP, pero no para la actividad dependiente de amoníaco de la aminasa 5'-XMP (Zalkin y Truitt, J. Biol. Sei. 252(15), 5431-5436, 1977; Massiere y Badet-Denisot, Cell Mol. Life Sei. 54, 205-222, 1998).

En el caso de la antranilato sintasa, que pertenece a la misma clase que la aminasa 5'-XMP, se informa de que la sustitución del residuo de cisteína conservado con glicina suprime la actividad de antranilato sintasa dependiente de glutamina pero no la actividad dependiente de NH<sub>3</sub> de la enzima (Paluh et al., J. Biol. Chem. 260, 1889-8601, 1985). Además, cuando el residuo de cisteína conservado de la para-aminobenzoato sintasa se reemplaza por serina, la producción del aducto de tioéster de  $\gamma$ -glutamilo se atenúa, lo que da lugar a una disminución en la producción de aminodesoxicorismato (Roux et al., Biochemistry, 32, 3763-3768, 1993). Al igual que para la carbamoil fosfato sintetasa, su actividad dependiente de glutamina también desaparece cuando el residuo de cisteína conservado se reemplaza con serina o glicina (Rubino et al., J. Biol. Chem., 261, 11320-11327, 1986).

Típicamente, puesto que las enzimas nativas han evolucionado hasta tener una actividad adecuada para las células, a menudo presentan propiedades inadecuadas para aplicaciones industriales debido a su baja actividad. Para superar este problema, se han estudiado típicamente en la técnica la clonación génica de una enzima de interés y la sobreexpresión de la misma. En la práctica, se aisló exitosamente un gen de aminasa 5'-XMP (*guaA*) a partir de *Escherichia coli* natural y se clonó en un plásmido de expresión inducible que se puede aplicar para la producción de 5'-GMP de 5'-XMP (Biosci. Biotech. Biochem. 61(5), 840-845, 1997).

Otro procedimiento de incremento de la expresión de proteínas de bacterias naturales usando resistencia a fármacos se describe en la publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 2000-004 0840. En esta publicación, se proporciona una cepa mutante que tiene una actividad potenciada de aminasa 5'-XMP, que se prepara impartiendo resistencia a decoyinina a una cepa de *Escherichia coli* natural, para incrementar la expresión de un gen de interés.

Los vectores de expresión inducible para uso general requieren inductores de expresión caros tales como IPTG, y por tanto no son adecuados para aplicaciones industriales que impliquen la producción de proteínas en una gran escala. Un sistema de expresión constitutiva surge como solución a este problema. Se ha informado de un gran número de sistemas de expresión constitutiva. En particular, se desarrolló un promotor de expresión constitutiva novedoso para *Corynebacterium ammoniagenes* conocida porque es adecuada para la producción fermentativa de ácidos nucleicos (solicitud de patente coreana n.º 2004-107215). Los sistemas de expresión constitutiva son útiles porque mantienen la expresión de una proteína introducida durante un periodo de cultivo de células huésped sin el uso de un inductor de expresión. Sin embargo, cuando la sobreexpresión de una proteína introducida afecta al crecimiento de células huésped, las células dejan de crecer, o se retira un vector introducido en las células, dando como resultado una baja eficacia de expresión. Se ha informado de los mismos resultados para la aminasa 5'-XMP (Biosci. Biotech. Biochem. 61(5), 840-845, 1997).

La detención del crecimiento o la retirada del vector en el sistema de expresión constitutiva de la aminasa 5'-XMP es atribuible, en la opinión de los presentes inventores, a la citotoxicidad del producto sobreexpresado constitutivamente. Como solución para eludir este problema, los presentes inventores suprimieron la actividad glutaminasa de 5'-XMP. Como se menciona anteriormente, puesto que la aminasa 5'-XMP utiliza la L-glutamina para convertir 5'-XMP en 5'-GMP dentro de las células, un mutante de aminasa 5'-XMP con actividad L-glutaminasa suprimida tiene una actividad disminuida en, y por tanto baja toxicidad para, las células. Además, el mutante de aminasa 5'-XMP retiene la actividad dependiente de amoníaco aunque pierde su actividad dependiente de glutamina, de modo que es aplicable para la conversión industrial de 5'-XMP en 5'-GMP. Por medio de un examen riguroso del mecanismo bioquímico de la aminasa 5'-XMP, los presentes inventores han desarrollado una aminasa 5'-XMP específica de amoníaco con glutaminasa suprimida y se han dado cuenta exitosamente de su actividad potenciada en el fluido de cultivo, dando lugar a la presente invención.

#### Divulgación de la invención

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un mutante de la aminasa ácido 5'-xantílico (XMP) específico de amoníaco que tenga una actividad potenciada, que se prepara impartiendo especificidad por amoníaco a una aminasa 5'-XMP natural o a un mutante de aminasa 5'-XMP que tenga una actividad potenciada.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento de preparación de un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco que tenga una actividad potenciada.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifique un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar un vector de expresión que lleve una molécula de ácido nucleico que codifique un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco.

- 5 Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar un transformante transformado con el vector de expresión anterior.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar un procedimiento de conversión de 5'-XMP a 5'-GMP usando un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco.

#### **Breve descripción de los dibujos**

- 10 El anterior y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se comprenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

La FIG. 1 muestra esquemáticamente un procedimiento para producir un mutante de aminasa 5'-XMP, que comprende la construcción de una colección de mutantes de aminasa 5'-XMP por mutagénesis aleatoria y el cribado de la colección de mutantes para seleccionar mutantes de aminasa 5'-XMP altamente activos;

- 15 La FIG. 2 muestra esquemáticamente un procedimiento para introducir un gen mutado aleatoriamente que codifica el mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo en un vector de expresión constitutivo;

La FIG. 3 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, G3;

- 20 La FIG. 4 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pF12 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, F12;

La FIG. 5 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pF63 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, F63;

La FIG. 6 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ-G3-1 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, G3-1;

- 25 La FIG. 7 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ-F12-1 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, F12-1;

La FIG. 8 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ-F63-1 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, F63-1;

- 30 La FIG. 9 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-G1 que lleva un gen que codifica una aminasa 5'-XMP natural, G1;

La FIG. 10 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-G3-1 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, G3-1;

La FIG. 11 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-F12-1 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, F12-1;

- 35 La FIG. 12 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-F63-1 que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP altamente activo, F63-1;

La FIG. 13 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-G1C que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco, G1C;

- 40 La FIG. 14 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-G3C que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco, G3C;

La FIG. 15 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-F12C que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco, F12C;

La FIG. 16 es una vista esquemática que muestra un vector de expresión pCJ1-F63C que lleva un gen que codifica un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco, F63C;

- 45 La FIG. 17 es un gráfico que muestra las actividades por unidad de una aminasa 5'-XMP natural (G1) derivada de *E. coli*, mutantes de 5'-XMP (G3-1, F12-1, F63-1) preparados por medio de mutagénesis aleatoria, y mutantes específicos de amoníaco (G1C, G3C, F12C, F63C) en medio de cultivo que contiene amoníaco o L-glutamina como sustrato, en el que Ammo significa amoníaco y Gln significa glutamina; y

La FIG. 18 es un gráfico que compara la estabilidad intracelular entre un vector de expresión que lleva un gen (G1) que codifica la aminasa 5'-XMP natural y un vector de expresión que lleva un gen (G1C) que codifica una aminasa 5'-XMP específica de amoníaco, en el que el residuo de cisteína en la posición 86 del gen G1 está sustituido con alanina.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

5 De acuerdo con un aspecto, se proporciona un mutante de aminasa de ácido 5'-xantílico (XMP) específico de amoníaco que tiene una actividad potenciada. Preferentemente, se puede preparar el mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco a partir de amilasa natural derivada de *Escherichia coli* o un mutante de la misma que tenga actividad potenciada.

10 Con mayor detalle, la mutagénesis dirigida a sitio para impartir especificidad por amoníaco se lleva a cabo en una aminasa 5'-XMP que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 para preparar un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco, derivado de *Escherichia coli*, que, por tanto, tiene actividad potenciada adicional.

15 En un modo de realización, para obtener un vector que exprese la aminasa 5'-XMP, se preparó un vector que lleva un de 1,578 pb de longitud (SEQ ID NO.: 1) que codifica la aminasa 5'-XMP derivada de *Escherichia coli* K12, seguido una reacción en cadena de polimerización que induce mutantes (PCR propensa a error) con el vector como molde. Como resultado, se obtuvieron moléculas de ADN de mutante de aminasa 5'-XMP, dentro de las que se introdujeron aleatoriamente mutaciones. Se insertaron las moléculas de ADN de mutante en un vector de expresión adecuado para expresar mutantes de aminasa 5'-XMP. Se transformaron los vectores resultantes en una cepa de *E. coli* deficiente en el gen de aminasa 5'-XMP para construir una colección de mutantes.

20 Puesto que la *E. coli* deficiente en el gen de aminasa 5'-XMP sólo puede crecer cuando se transforma con un vector que expresa un mutante que tiene actividad de aminasa 5'-XMP, sólo se obtuvieron mutantes activos de aminasa 5'-XMP a partir de la colección de mutantes.

25 Para seleccionar clones de *E. coli* clones transformados con un vector que expresa una forma mutante altamente activa de aminasa 5'-XMP a partir de colonias cultivadas de *E. coli*, se realizó la conversión de 5'-XMP en 5'-GMP en microplacas de 96 pocillos. Después de que se terminara la reacción, se seleccionaron los clones de *E. coli* que producen aminasa 5'-XMP con una actividad incrementada comparando los valores de absorbancia con un control.

30 Se determinaron las secuencias de nucleótidos de mutantes de aminasa 5'-XMP con una actividad potenciada usando un procedimiento conocido. La comparación de las secuencias de nucleótidos entre mutantes de aminasa 5'-XMP y aminasa 5'-XMP natural divulgó que seis mutantes seleccionados de aminasa 5'-XMP tuvieron nuevas secuencias de aminoácidos cada una alterada en dos, dos, cuatro, cuatro, tres y seis residuos aminoácidos, y se designaron como "aminasa 5'-XMP G3", "aminasa 5'-XMP F12", "aminasa 5'-XMP F63", "aminasa 5'-XMP G3-1", "aminasa 5'-XMP F12-1" y "aminasa 5'-XMP F63-1", respectivamente.

35 Cada mutante tiene una alteración en su secuencia de aminoácidos en comparación con la de una aminasa 5'-XMP natural, como se describe en detalle a continuación. El mutante G3 tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 4) en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 52 y 191 están reemplazados por cisteína y treonina, respectivamente. El mutante F12 tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 6) en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 93 y 152 están reemplazados por valina y prolina, respectivamente. El mutante F63 tiene un residuo valina en la posición 93, un residuo alanina en la posición 113, un residuo treonina en la posición 191, y un residuo glicina en la posición 467 en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 8). Al igual que para el mutante G3-1, su secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 10) caracteriza un residuo cisteína en la posición 52, un residuo treonina en la posición 191, un residuo arginina en la posición 253, y un residuo isoleucina en la posición 454. El mutante F12-1 tiene una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 12) en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 93, 152 y 454 están reemplazados por valina, prolina y isoleucina, respectivamente. En el mutante F63-1 (SEQ ID NO.: 14), valina se encuentra en la posición 93, isoleucina en la posición 100, alanina en la posición 113, treonina en la posición 191, isoleucina en la posición 454, y glicina en la posición 467.

45 Posteriormente, para preparar aminasa 5'-XMP específica de amoníaco, la aminasa 5'-XMP natural derivada de *Escherichia coli* y los mutantes G3-1, F12-1 y F63-1 con actividad potenciada se sometieron a mutagénesis dirigida a sitio preparar reemplazar el residuo cisteína en la posición 86 dentro del sitio activo de glutaminasa con alanina. Después de la mutagénesis dirigida a sitio, los mutantes resultantes se designaron como G1C (SEQ ID NO.: 16), G3C (SEQ ID NO.: 18), F12C (SEQ ID NO.: 20), y F63C (SEQ ID NO.: 22), respectivamente. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de estos mutantes de aminasa 5'-XMP usando un procedimiento de secuenciación de bases conocido. Se descubrió que los mutantes resultantes utilizaban, como dador de amina, glutamina con una eficacia muy baja, pero amoníaco externo con una gran eficacia.

55 De acuerdo con un modo de realización preferente de este aspecto de la presente invención, por tanto, se proporciona un mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.: 16, 18, 20 o 22.

En la siguiente sección de ejemplos, sólo se describen los procedimientos de preparación de los mutantes de aminosasa 5'-XMP específicos de amoníaco que tienen SEQ ID NO.: 16, 18, 20 y 22, junto con sus actividades, pero se entenderá por completo por los expertos en la técnica que los mutantes de aminosasa 5'-XMP específicos de amoníaco que tienen una actividad potenciada se pueden preparar fácilmente impartiendo especificidad por amoníaco a los mutantes de aminosasa 5'-XMP de actividad potenciada de SEQ ID NO.: 4, 6 y 8.

Además, sólo los mutantes de 5'-XMP que tienen secuencias de aminoácidos en las que el residuo cisteína en la posición 86 está reemplazado por alanina se describen en la siguiente sección de ejemplos, pero los expertos en la técnica entenderán por completo que los mutantes de aminosasa 5'-XMP específicos de amoníaco se pueden obtener fácilmente cuando un residuo aminoacídico, tal como serina o glicina, en lugar de alanina, se introduce usando una técnica de mutagénesis dirigida a sitio.

Además, el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de la presente invención no quiere decir sólo las proteínas que tienen cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 16, 18, 20 o 22, sino que también incluye un equivalente funcional que ejerce la actividad idéntica a estas proteínas mutantes. El término "equivalente funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que tiene una secuencia diferente de una secuencia de aminoácidos del mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de la presente invención, por una delección, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora o combinaciones de las mismas en uno o más residuos aminoacídicos, y que ejerce la actividad de aminosasa 5'-XMP específica de amoníaco de forma casi exactamente tan alta como la de la aminosasa 5'-XMP específica de amoníaco de la presente invención. Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que, en general, no alteran la actividad de las proteínas o péptidos, son conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979).

Se descubrió que, cuando los mutantes de aminosasa 5'-XMP específicos de amoníaco de la presente invención se expresan usando un sistema de expresión constitutiva, como se describirá después, tienen mayor actividad por solución de reacción que la forma nativa. En detalle, se mide la actividad incrementada hasta una cantidad de 1,6 veces para el mutante de aminosasa 5'-XMP G1C, 1,4 veces para el mutante de aminosasa 5'-XMP G3C, 1,4 veces para el mutante de aminosasa 5'-XMP F12C, y 1,45 veces para el mutante de aminosasa 5'-XMP F63C, en comparación con la forma nativa. Por lo tanto, los mutantes de aminosasa 5'-XMP específicos de amoníaco pueden ser altamente útiles en la producción de 5'-GMP.

Los mutantes de aminosasa 5'-XMP específicos de amoníaco de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por un procedimiento de síntesis química (Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963), o por un procedimiento recombinante de ADN (Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2ª ed., 1989). Cuando se usa una técnica de recombinación genética, se puede obtener un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco en un vector de expresión adecuado, transformando el vector de expresión recombinante en una célula huésped, cultivando la célula huésped para expresar el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco, y recuperando el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de la célula huésped.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, por tanto, se proporciona un procedimiento para preparar un mutante de 5'-XMP específico de amoníaco que tiene actividad potenciada. Con mayor detalle, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco desprovisto de actividad glutaminasa, que presente una actividad *in vivo* mínima y por tanto, se reduce considerablemente en citotoxicidad, pero con una actividad dependiente de amoníaco que permanece sin cambios, pudiendo de este modo convertir eficazmente 5'-XMP a 5'-GMP.

En la presente invención, el residuo cisteína en la posición 86 dentro del sitio activo de glutaminasa de aminosasa 5'-XMP derivada de *E. coli* se reemplaza por alanina, serina o glicina por medio de mutagénesis dirigida a sitio, de modo que el nuevo aminoácido en la posición 86 no puede formar un enlace tioéster de  $\gamma$ -glutamilo con el ácido glutámico en 183, suprimiendo de este modo la actividad dependiente de glutamina pero conservando la actividad dependiente de amoníaco. En un modo de realización preferente, el procedimiento para preparar un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco se efectúa reemplazando el residuo cisteína en la posición 86 de aminosasa 5'-XMP derivada de *Escherichia coli* con alanina.

En este aspecto de la presente invención, el mutante de 5'-XMP específico de amoníaco se prepara reemplazando el residuo cisteína en la posición 86 de una secuencia de aminoácidos por el mutante de aminosasa 5'-XMP que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO.: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 con alanina, glicina o serina, proporcionada de acuerdo con los modos de realización de la presente invención, que tiene una actividad potenciada.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifique un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco.

En un modo de realización preferente de este aspecto de la presente invención, el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco G1C de SEQ ID NO.: 16 se codifica por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO.: 15, el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco G3C de SEQ ID NO.: 18 por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO.: 17, el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco F12C de SEQ ID NO.: 20 por la molécula de

ácido nucleico de SEQ ID NO.: 19, y el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco F63C de SEQ ID NO.: 22 por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO.: 21. Las secuencias de las moléculas de ácido nucleico pueden ser monocatenarias o bicatenarias, y se pueden formar por ARN (ARNm) por sustitución de uracilo (U) con timina (T) en una molécula o secuencia de ADN.

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de la presente invención se puede introducir en un vector para expresar el mutante para que se exprese como una proteína.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión que lleva una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco.

- 10 Como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" que describe un vector que puede expresar una proteína en una célula huésped adecuada, se refiere a una construcción genética que comprende elementos reguladores esenciales a los que se une de forma funcional un inserto de gen de tal forma que se exprese en una célula huésped.

- 15 Por el término "unido de forma funcional", como se usa en el presente documento, se quiere decir que existe un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácidos nucleicos y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína diana de tal forma que permita funciones generales. Por ejemplo, se puede enlazar de forma funcional un promotor a un ácido nucleico que codifica una proteína, y puede afectar a la expresión de la secuencia de ácido nucleico codificante. El enlace funcional a un vector recombinante se puede preparar usando una técnica de recombinación genética que es bien conocida en la técnica, y la escisión y ligación de ADN específica de sitio se puede lograr usando enzimas conocidas generalmente en la técnica. Los promotores útiles en un vector de expresión pueden ser los disponibles de las células huésped *Escherichia* spp. o *Bacillus* spp. Los ejemplos de promotores útiles en *Escherichia* spp. incluyen promotor *trc*, promotor *trp*, promotor *lac*, promotor *recA*, promotor  $\lambda$ PL, promotor *lpp* y promotor T7. Al igual que para la especie *Bacillus* como células huésped, los promotores útiles obtenidos a partir de las mismas se pueden ejemplificar por promotor SP01, promotor SP02 y promotor *penP*. Los codones de iniciación y detención son necesarios para que sean funcionales en un individuo al que se le ha administrado una construcción genética, y deben estar en fase con la secuencia codificante. Un vector de expresión también puede incluir un marcador seleccionable que permite la selección de célula huésped que contienen el vector. Un vector de expresión replicable puede incluir un origen de replicación.

- 20 En una práctica de la presente invención, se construyeron vectores de expresión, pCJ1-G1C, pCJ1-G3C, pCJ1-F12C y pCJ1-F63C, llevando cada uno un gen que codifica un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco, de los que las estructuras se muestran en diagramas esquemáticos de las FIG. 13, 14, 15 y 16, respectivamente. Estos vectores de expresión se introdujeron individualmente en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  para obtener *Escherichia coli* transformada. Los transformantes así producidos se designaron como "*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pCJ1-G1C", "*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pCJ1-G3C", "*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pCJ1-F12C" y "*Escherichia coli* DH5  $\alpha$ /pCJ1-F63C", respectivamente, y se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 2 de diciembre de 2005, con los números de acceso KCCM-10715P, KCCM-10717P, KCCM-10721P y KCCM-10720, respectivamente.

Por lo tanto, aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un transformante transformado con uno de los vectores de expresión.

- 40 La transformación incluye cualquier procedimiento por el que se pueden introducir ácidos nucleicos en microorganismos, células, tejidos u órganos, y, como es conocido en la técnica, se pueden realizar usando al menos una seleccionar de forma adecuada de las técnicas estándar que dependen de células huésped. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio (CaPO<sub>4</sub>), precipitación con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), y agitación con fibra de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacterias, y transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano, y transformación mediada por lipofectamina.

- 45 Las células huésped más adecuadas para los objetivos se pueden seleccionar y usar porque los niveles de expresión, modificación, o similares de las proteínas varían dependiendo de las células huésped en las que se transforma un vector de expresión que expresa el mutante de aminosasa 5'-XMP de la presente invención. Las células huésped incluyen, pero sin limitarse a, células procariontas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus*.

- 50 Además, como células huésped se pueden utilizar células eucariotas inferiores, tales como hongos (por ejemplo, especie *Aspergillus*) y levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Neurospora crassa*).

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un mutante de aminosasa 5'-XMP, que comprende cultivar el transformante y aislar una proteína mutante de aminosasa 5'-XMP del fluido del cultivo.

- 55 El cultivo de células huésped (transformantes) transformadas con un vector de expresión que expresa el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de la presente invención se puede llevar a cabo bajo condiciones de cultivo

adecuadas para expresar la proteína objetivo, el mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco, usando un procedimiento generalmente conocido por los expertos en la técnica.

Las proteínas de la presente invención, expresadas en células huésped, se pueden purificar por procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos de desalado (por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio, precipitación de fosfato de sodio, etc.), precipitación de disolvente (por ejemplo, precipitación de fracción de proteína usando acetona, etanol, etc.), diálisis, filtración de gel, procedimientos de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase inversa, y ultrafiltración, por separado o en combinación, para purificar las proteínas mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco de la presente invención.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como límite de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción de la colección de mutantes de aminasa 5'-XMP

Se introdujeron mutaciones aleatorias en un gen de aminasa 5'-XMP por una reacción en cadena de polimerización que induce mutantes (PCR propensa a error), para preparar varios mutantes de aminasa 5'-XMP como sigue.

En primer lugar, se unió de forma funcional un gen de aminasa 5'-XMP (SEQ ID NO.: 1) de 1,578 pb derivado de *Escherichia coli* a un vector de expresión, pTrc99a, que incluye un promotor trc y un origen de replicación funcional en *Escherichia coli*, proporcionando así un plásmido recombinante, pGI, como molde para PCR propensa a error. Se realizó esta PCR con un par de un cebador N-terminal, representado por SEQ ID NO.: 23, y un cebador C-terminal, representado por SEQ ID NO.: 24. Se sintetizaron los cebadores en base a la secuencia de nucleótidos del gen de aminasa 5'-XMP derivado de *E. coli*.

SEQ ID NO: 23: 5' CGCGAATTCATGACGGAAAACATTCATAA 3'

SEQ ID NO: 24: 5' CTAGTCTAGATCATTCCCACTCAATGGT 3'

Se realizó una mezcla de PCR para que contuviera 0,4 mM de N-cebador y de C-cebador de cada uno, 5 ng del plásmido recombinante pGI, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dCTP 1 mM, dTTP 1 mM y 5 unidades de Taq polimerasa, en un volumen final de 50 ml. Se llevó a cabo la PCR propensa a error con 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineación a 50 °C durante 1 min, y elongación a 72 °C durante 1 min, seguido de elongación final a 72 °C durante 7 min, para producir genes mutantes.

Se separaron los productos de PCR así preparados por electroforesis en gel de agarosa. Se digirieron los fragmentos de ADN purificados en gel con EcoRI y HindIII y se insertaron en un vector de expresión, pTrc99a, útil para expresar aminasa 5'-XMP, construyendo así los plásmidos recombinantes. Se introdujeron los vectores recombinantes que llevaban los mutantes de genes de aminasa 5'-XMP en *Escherichia coli* BW (cepa con gen *guaA* inactivado) para construir una colección de mutantes de aminasa 5'-XMP. Se preparó una cepa de *Escherichia coli* BW con gen *guaA* eliminado usando un procedimiento de biología molecular ordinario (Datsenko KA, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci., 97(12), 6640-6645).

Ejemplo 2: Cribado para mutantes de aminasa 5'-XMP

Se untó un caldo de la colección de mutante de aminasa 5'-XMP preparado en el ejemplo 1 sobre placas LB que contenían bacto triptona al 0,5 %, extracto de levadura al 1 %, NaCl al 1 %, agar al 1,5 % y IPTG 0,2 mM. Se cultivaron las colonias de *Escherichia coli* crecidas en medio LB en microplacas de pocillos hondos. A continuación, se diluyó el cultivo de acuerdo con el grado de crecimiento hasta dar un volumen final de 100 ml. Se añadieron 5 ml de xileno a cada pocillo de las placas, y se incubaron las placas a 37 °C durante 30 min. Se añadieron 100 ml de una solución de sustrato precalentada hasta 42 °C a cada pocillo antes de la incubación de las placas a 42 °C durante 20 min. La solución de sustrato estaba compuesta de XMP 30 mM, ATP 13 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16 mM y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM en tampón de HCl Trizma 16 mM (pH 8,6). Después de la adición de 800 ml de ácido perclórico al 3,5 % a cada pocillo para terminar la reacción, se transfirieron 200 ml de la mezcla de reacción en una microplaca transparente UV de 96 pocillos para medir la absorbancia a 290 nm. Se midió el rendimiento de 5'-GMP y se compararon las actividades enzimáticas para seleccionar un transformante de *Escherichia coli* JM105 que expresara un mutante de aminasa 5'-XMP con actividad potenciada.

Se digirieron el plásmido pG3 así obtenido, que lleva un gen mutante de aminasa 5'-XMP, y el plásmido pGI que lleva un gen de aminasa 5'-XMP nativa con enzimas de restricción apropiadas, se ligaron y se sometieron a PCR propensa a error bajo las mismas condiciones que en el ejemplo 1. El cribado para determinar la actividad enzimática y la comparación de las actividades dio como resultado la obtención de los plásmidos pF12, pF63, pCJ-G3-1, pCJ-F12-1 y pCJ-F63-1, que expresaron la aminasa 5'-XMP con actividad potenciada con relación a la enzima original.

La FIG. 1 ilustra esquemáticamente un procedimiento para producir un mutante de aminasa 5'-XMP con actividad potenciada, descrito en los ejemplos 1 y 2.

La escala de la colección de mutantes de aminasa 5'-XMP y



las descripciones de los mutantes preparados en el ejemplo 2 se resumen en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1 Evolución molecular de aminasa 5'-XMP y mutantes seleccionados

	1R	2R
Gen original	Gen <i>guaA</i> nativo	Gen nativo y gen mutante G3
Procedimiento de construcción de colección	PCR propensa a error	Digestión de enzima de restricción y PCR propensa a error
Escala de colección	> $\sim 10^5$	> $\sim 1,500$
1° cribado	$\sim 2 \times 10^3$	$\sim 1,500$
2° cribado	73 colonias	66 colonias
Mutantes obtenidos	G3	F12, F63, G3-1, F12-1, F63-1

Ejemplo 3: Secuenciación de bases de genes que codifican mutantes de aminasa 5'-XMP

5 Se analizaron secuencias de nucleótidos de mutantes de aminasa 5'-XMP, preparados en los ejemplos 1 y 2, usando un modelo de secuenciador automático ABI3730xl (Applied Biosystems). Se identificaron las secuencias de nucleótidos como SEQ ID NO.: 3 para el mutante G3, SEQ ID NO.: 5 para el mutante F12, SEQ ID NO.: 7 para el mutante F63, SEQ ID NO.: 9 para el mutante G3-1, SEQ ID NO.: 11 para el mutante F12-1, y SEQ ID NO.: 13 para el mutante F63-1. Además, las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos se representan, respectivamente, por SEQ ID NO.: 4 (G3), SEQ ID NO.: 6 (F12), SEQ ID NO.: 8 (F63), SEQ ID NO.: 10 (G3-1), SEQ ID NO.: 12 (F12-1), y SEQ ID NO.: 14 (F63-1). Los mapas esquemáticos de los plásmidos que llevan genes que codifican los mutantes G3, F12, F63, G3-1, F12-1 y F63-1 se dan en las FIG. 3, 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

15 Con mayor detalle, se dedujo la secuencia de aminoácidos del mutante G3 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de aminasa 5'-XMP G3 altamente activo en el plásmido pG3, y se representa por SEQ ID NO.: 4. Se dedujo la secuencia de aminoácidos del mutante F12 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de aminasa 5'-XMP F12 altamente activo en el plásmido pF12, y se representa por SEQ ID NO.: 6. Asimismo, se dedujo la secuencia de aminoácidos del mutante F63 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de aminasa 5'-XMP F63 altamente activo en el plásmido pF63, y se representa por SEQ ID NO.: 8. Se dedujo la secuencia de aminoácidos del mutante G3-1 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de aminasa 5'-XMP G3-1 altamente activo en el plásmido Pg3-1, y se representa por SEQ ID NO.: 10. Se dedujo la secuencia de aminoácidos del mutante F12-1 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de aminasa 5'-XMP F12-1 altamente activo en el plásmido pCJ-F12-1, y se representa por SEQ ID NO.: 12. Se dedujo la secuencia de aminoácidos del mutante F63-1 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen mutante de aminasa 5'-XMP F63-1 altamente activo en el plásmido pCJ-F63-1, y se representa por SEQ ID NO.: 14.

25 Cuando se compararon las secuencias de aminoácidos de los mutantes de aminasa 5'-XMP altamente activos G3, F12, F63, G3-1, F12-1 y F63-1 con la secuencia de aminoácidos de la aminasa 5'-XMP nativa, representada por SEQ ID NO.: 2, se descubrió que tenían sustituciones de aminoácidos para dos, dos, cuatro, cuatro, tres y seis residuos aminoácidos, respectivamente.

30 En detalle, el mutante G3 tiene una secuencia de aminoácidos en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 52 y 191 están reemplazados por cisteína y treonina, respectivamente. El mutante F12 tiene una secuencia de aminoácidos en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 93 y 152 están reemplazados por valina y prolina, respectivamente. El mutante F63 tiene una secuencia de aminoácidos que caracteriza un residuo valina en la posición 93, un residuo alanina en la posición 113, un residuo treonina en la posición 191 y un residuo glicina en la posición 467. El mutante G3-1 tiene una secuencia de aminoácidos en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 52, 191, 253 y 454 están reemplazados por cisteína, treonina, arginina e isoleucina, respectivamente. El mutante F12-1 tiene una secuencia de aminoácidos en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 93, 152 y 454 están reemplazados por valina, prolina e isoleucina, respectivamente. El mutante F63-1 tiene una secuencia de aminoácidos en la que existen sustituciones de residuos aminoácidos en la posición 93 para valina, posición 100 para isoleucina, posición 113 para alanina, posición 191 para treonina, posición 454 para isoleucina y posición 467 para glicina. Los resultados del análisis de las secuencias de aminoácidos y el ensayo de actividad enzimática indican que los mutantes G3, F12, F63, G3-1, F12-1 y F63-1 son formas mutantes de aminasa 5'-XMP novedosas, de las que cada una tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de aminasa 5'-XMP de *E. coli* nativa y es altamente activa.

## Ejemplo 4: Construcción del vector de expresión constitutivo del mutante de 5'-XMP

Se expresaron los mutantes de aminosasa 5'-XMP altamente activos preparados anteriormente usando un vector de expresión constitutivo como sigue.

5 Se unieron de forma funcional los genes mutantes y naturales de aminosasa 5'-XMP el vector de expresión constitutivo pECG117-CJI, que incluye un promotor CJ1 y un origen de replicación funcional en *Escherichia coli* y *Corynebacterium ammoniagenes*, para producir plásmidos recombinantes. Se realizó una PCR propensa a error con un conjunto del cebador N-terminal (guaA-f) de SEQ ID NO.: 25 y el cebador C-terminal (guaA-r) de SEQ ID NO.: 26. Se sintetizaron estos cebadores en base a la secuencia de nucleótidos del gen de aminosasa 5'-XMP derivado de *Escherichia coli*.

SEQ ID NO: 25: 5' ACGTGCCGGCATGACGGAAAACATTCATAAGC 3'

10 SEQ ID NO: 26: 5' ACGTGGATCCTCATTCCCCTCAATGGTAGC 3'

15 Una mezcla de PCR estaba compuesta de 0,4 mM de N-cebador y C-cebador de cada uno, 5 ng del plásmido recombinante pG1, pCJ-G3-1, pCJ-F12-1 o pCJ-F63-1, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dCTP 0,2 mM, dTTP 0,2 mM y 5 unidades de Pfu polimerasa, en un volumen final de 50 ml. Se llevó a cabo la PCR propensa a error con 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineación a 50 °C durante 1 min, y elongación a 72 °C durante 1 min, seguido de elongación final a 72 °C durante 5 min.

20 Se separaron los productos de PCR así preparados por electroforesis en gel de agarosa. Se digirieron los fragmentos de ADN purificados en gel con NaeI y BamHI y se insertaron en un vector de expresión, pECG117-CJI, útil para expresar aminosasa 5'-XMP, para construir plásmidos recombinantes (FIG. 2). Los vectores recombinantes que llevan los genes naturales y mutantes de aminosasa 5'-XMP se designaron como pCJ1-G1 (natural), pCJ1-G3-1, pCJ1-F12-1 y pCJ1-F63-1, respectivamente, de los que las estructuras se muestran en los diagramas esquemáticos de las FIG. 9, 10, 11 y 12, respectivamente.

## Ejemplo 5: Producción de aminosasa 5'-XMP específica de amoníaco

25 Se produjo aminosasa 5'-XMP específica de amoníaco aprovechando la aminosasa 5'-XMP natural y los mutantes de la aminosasa 5'-XMP altamente activa preparados en los ejemplos anteriores. A este respecto, se diseñaron un par de cebadores para introducir una mutación de un residuo cisteína en la posición 86 a alanina, y se representó por SEQ ID NO.: 27 y 28

SEQ ID NO: 27: 5' CCGGTATTCGGCGTTGCATATGGCATGCAGACCATG 3'

SEQ ID NO: 28: 5' CATGGTCTGCATGCCATATGCAACGCCGAATACCGG 3'

30 En presencia de estos cebadores, se realizó una mutagénesis dirigida a sitio usando un kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange II XL, disponible comercialmente de Stratagene, de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se aislaron plásmidos de las colonias formadas y se usaron para determinar las secuencias de nucleótidos de los genes así obtenidos. Como resultado, se obtuvieron mutantes de 5'-XMP novedosos, en los que, en base a la aminosasa 5'-XMP natural o a los mutantes de la misma, se sustituyó un residuo de alanina por cisteína en la posición 86, y se designaron como G1C, G3C, F12C y F63C, respectivamente.

35 Para examinar si se introdujo la mutación correcta en la posición deseada, se analizaron las secuencias de nucleótidos de mutantes de aminosasa 5'-XMP usando un secuenciador automático ABI3730xl, fabricado por Applied Biosystems. Se identificaron las secuencias de nucleótidos como SEQ ID NO.: 15 (G1C), SEQ ID NO.: 17 (G3C), SEQ ID NO.: 19 (F12C), y SEQ ID NO.: 21 (F63C). Se construyeron plásmidos que llevaban genes que codifican los mutantes de aminosasa 5'-XMP y se designaron como pCJ1-G1C, pCJ1-G3C, pCJ1-F12C y pCJ1-F63C, respectivamente, de los que los mapas esquemáticos se dan en las FIG. 13, 14, 15 y 16, respectivamente.

40

## Ejemplo 6: Evaluación de la actividad de los mutantes de aminosasa 5'-XMP

45 Se evaluó la actividad específica de aminosasa 5'-XMP como sigue. En primer lugar, se midieron los niveles de expresión de proteína en un gel SDS-PAGE usando un analizador para concentración de proteína. Como resultado, los mutantes de aminosasa 5'-XMP presentaron niveles de expresión similares entre sí, lo que indica que la actividad potenciada de los mutantes de aminosasa 5'-XMP resultó del incremento en la actividad específica.

50 Se comparó la actividad de los mutantes de aminosasa 5'-XMP con la de la forma nativa, como sigue. En primer lugar, se inocularon los transformantes que expresan mutantes en 25 ml de un medio de cultivo que contenía 16 g/l de bactotripton, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 50 mg/l de kanamicina, y se cultivó a 37 °C durante 12 h. Después de que se recuperaran las células cultivadas, se mezcló 1 ml de cada fluido de cultivo con 20 ml de xileno y se incubó a 37 °C durante 20 min con agitación a 250 rpm. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción 10 veces antes de que se llevaran a cabo los ensayos para determinar la reactividad con amoníaco. A este respecto, se mezclaron 200 ml de la solución de enzima diluida con 800 ml de una solución de sustrato que estaba compuesta de XMP 30 mM, ATP 13 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16 mM y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM en tampón HCl Trizma 200 mM (pH 8,6), y se incubó a 42 °C

durante 15 min. Se mezclaron 200 ml de la mezcla de reacción resultante con 3,8 ml de TCA al 0,175 % para terminar la reacción, y se sometió a HPLC para determinar la cantidad de 5'-GMP producida. Por separado, para medir la actividad catalítica de los mutantes de aminasa 5'-XMP con glutamina como sustrato, se mezclaron 200 ml de la solución de enzima diluida 10 veces con 800 ml de una solución de sustrato que estaba compuesta de XMP 30 mM, ATP 13 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16 mM y L-glutamina 5 mM en tampón HCl Trizma 200 mM (pH 8,6), seguido de incubación a 42 °C durante 15 min. Se analizó cuantitativamente el producto 5'-GMP usando HPLC. Se definió una unidad de actividad de aminasa 5'-XMP como la cantidad de enzima que forma un micromol de 5'-GMP por minuto. Se realizó una HPLC bajo las siguientes condiciones.

Eluyente A:

- 10 Tetrabutilamonio dihidrógeno fosfato al 0,02 %  
amonio hidrógeno fosfato al 0,2 %, pH 2,4

Eluyente B: acetonitrilo

A:B = 97:3

Longitud de onda de medida: 254 nm

- 15 Caudal: 1,0 ml/min

Cuando se usa amoníaco como sustrato, se mide la actividad enzimática como sigue. Se midieron 13,61 U/ml en la aminasa 5'-XMP natural, 17,62 U/ml en la aminasa G3-1, 20,82 U/ml en el mutante F12-1, y 16,47 U/ml en el mutante F63-1. Al igual que para los mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco, se midieron 22,64 U/ml en el mutante G1C, 19,30 U/ml en el mutante G3C, F12C, 22,76 U/ml en el mutante F12C, y 19,62 U/ml en el mutante F63C.

- 20 Por otra parte, cuando se usa L-glutamina como sustrato, se mide la actividad enzimática como sigue. Se analizaron 8,32 U/ml en la cepa natural, 19,15 U/ml en el mutante G3-1, 4,31 U/ml en el mutante F12-1, y 0,54 U/ml en el mutante F63-1. Al igual que para los mutantes 5'-XMP específicos de amoníaco, se descubrió que las actividades enzimáticas eran de 0,21 U/ml para G1C, 0,16 U/ml para G3C, 0,24 U/ml para F12C, y 0,40 U/ml para F63C.

- 25 Como es evidente de los datos anteriores, los mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco son casi inactivos en la conversión de 5'-XMP a 5'-GMP cuando se usa L-glutamina como sustrato, pero se descubrió que tienen una actividad aproximadamente de 1,4 a 1,7 veces mayor en la conversión de 5'-XMP a 5'-GMP en presencia de amoníaco que los correspondientes mutantes naturales o aleatorios (FIG. 17).

Ejemplo 7: Estabilidad intracelular de los vectores de expresión para los mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco

- 30 Para comparar los vectores de expresión de los mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco con respecto a la estabilidad intracelular, se midieron cuantitativamente los vectores de expresión restantes tras el cultivo.

Después de la terminación del cultivo, se diluyó el fluido de cultivo hasta 10<sup>-5</sup> su concentración original y se untó sobre placas LB (Bacto-Trypton al 1 %, extracto de levadura al 1 %, NaCl al 0,5 %) que contenían 50 g/ml de kanamicina o bien ningún antibiótico. La incubación a 30 °C durante 16 h se siguió del recuento del número de colonias formadas. Se expresaron los números de colonias como porcentajes del control, y los resultados se representan en la FIG. 18.

- 35 Como se observa en la FIG. 18, el número de colonias en las que está contenido el vector de expresión que lleva el gen que codifica el mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco G1C ascendió a un 54,3 % del control, mientras que en el caso de la aminasa 5'-XMP natural, el número no es mayor de un 36,0 %. Estos datos indican que el vector de expresión que lleva un gen que codifica la aminasa 5'-XMP específica de amoníaco es más estable dentro de la célula, potenciando así la actividad catalítica.

### Aplicabilidad industrial

Como se describe y se demuestra anteriormente en el presente documento, para producir eficazmente 5'-GMP útil como potenciador del sabor, la presente invención proporciona mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco impartiendo especificidad de amoníaco a la aminasa 5'-XMP natural y mutantes de aminasa 5'-XMP mutados aleatoriamente que tienen actividad potenciada, junto con un procedimiento de preparación del mismo. Además de tener una actividad potenciada con relación a la forma nativa, los mutantes de aminasa 5'-XMP específicos de amoníaco de la presente invención son útiles en un procedimiento biológico para producir 5'-GMP debido a que se pueden mantener de forma estable dentro de las células debido a su baja citotoxicidad.

50

ES 2 476 425 T3

<110> CJ Corporation

<120> Mutante de aminasa 5'-XMP específico de amoníaco

5 <160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

10 <211> 1578

<212> ADN

<213> Escherichia coli K12

<220>

15 <221> gen

<222> (1)..(1578)

<223> Secuencia de ADN para el gen natural G1 de aminasa XMP (guaA)

<220>

20 <221> CDS

<222> (1) .. (1575)

<223> Secuencia de aminoácidos de G1 natural de aminasa XMP

<400> 1

atg	acg	gaa	aac	att	cat	aag	cat	cgc	atc	ctc	att	ctg	gac	ttc	ggt	48
Met	Thr	Glu	Asn	Ile	His	Lys	His	Arg	Ile	Leu	Ile	Leu	Asp	Phe	Gly	
1				5					10					15		
tct	cag	tac	act	caa	ctg	ggt	gcg	cgc	gtg	cgt	gag	ctg	ggt	ggt		96
Ser	Gln	Tyr	Thr	Gln	Leu	Val	Ala	Arg	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Gly	Val	
			20					25					30			
tac	tgc	gaa	ctg	tgg	gcg	tgg	gat	gtg	aca	gaa	gca	caa	att	cgt	gac	144
Tyr	Cys	Glu	Leu	Trp	Ala	Trp	Asp	Val	Thr	Glu	Ala	Gln	Ile	Arg	Asp	
		35					40						45			
ttc	aat	cca	agc	ggc	att	att	ctt	tcc	ggc	ggc	ccg	gaa	agt	act	act	192
Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Gly	Gly	Pro	Glu	Ser	Thr	Thr	
	50					55					60					
gaa	gaa	aac	agt	ccg	cgt	gcg	ccg	cag	tat	gtc	ttt	gaa	gca	ggc	gta	240
Glu	Glu	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Pro	Gln	Tyr	Val	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	
65					70					75					80	
ccg	gta	ttc	ggc	ggt	tgc	tat	ggc	atg	cag	acc	atg	gca	atg	cag	ttg	288
Pro	Val	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Gly	Met	Gln	Thr	Met	Ala	Met	Gln	Leu	
			85					90						95		
ggc	ggt	cac	ggt	gaa	gcc	tct	aac	gaa	cgt	gaa	ttt	ggc	tac	gcg	cag	336
Gly	Gly	His	Val	Glu	Ala	Ser	Asn	Glu	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ala	Gln	
			100					105					110			
ggt	gaa	gtc	gta	aac	gac	agc	gca	ctg	ggt	cgc	ggt	atc	gaa	gat	gcg	384
Val	Glu	Val	Val	Asn	Asp	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Ile	Glu	Asp	Ala	
		115					120					125				
ctg	acc	gca	gac	ggt	aaa	ccg	ctg	ctc	gat	gtc	tgg	atg	agc	cac	ggc	432
Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Ser	His	Gly	
		130				135					140					
gat	aaa	ggt	acc	gct	att	ccg	tcc	gac	ttc	atc	acc	gta	gcc	agc	acc	480
Asp	Lys	Val	Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Thr	
145					150					155					160	

gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat	528
Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr	
165 170 175	
ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt atg cgc	576
Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg	
180 185 190	
atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg	624
Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Ala Leu Trp	
195 200 205	
acg cca gcg aaa att atc gac gat gct gta gct cgc atc cgc gag cag	672
Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln	
210 215 220	
gta ggc gac gat aaa gtc atc ctc gcc ctc tct ggt ggt gtg gat tcc	720
Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser	
225 230 235 240	
tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aaa aac ctg act	768
Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr	
245 250 255	
tgc gta ttc gtc gac aac gcc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag	816
Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln	
260 265 270	
gtt ctg gat atg ttt gcc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta	864
Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val	
275 280 285	
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg	912
Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro	
290 295 300	
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat	960
Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp	
305 310 315 320	
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag gcc acc	1008
Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr	
325 330 335	
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca	1056
Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala	
340 345 350	
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg gcc gcc ctg ccg aaa gag atg	1104
His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met	
355 360 365	
aag atg gcc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg	1152
Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val	
370 375 380	
cgt aag att ggt ctg gag ctg gcc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt	1200
Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg	
385 390 395 400	
cac ccg ttc ccg gga cca gcc ctt gcc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg	1248
His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val	
405 410 415	



Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
 165 170 175  
 Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg  
 180 185 190  
 Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
 195 200 205  
 Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
 210 215 220  
 Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
 260 265 270  
 Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285  
 Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro  
 290 295 300  
 Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335  
 Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350  
 His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365  
 Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430  
 Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460  
 Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

```

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu
515 520 525
<210> 3
<211> 1578
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN del mutante G3

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1575)
<223> Secuencia de aminoácidos del mutante G3 de aminasa XMP

<400> 3
atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt 48
Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly
1 5 10 15

tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt 96
Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val
20 25 30

tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac 144
Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp
35 40 45

ttc aat cca tgc ggc att att ctt tcc ggc ggc ccg gaa agt act act 192
Phe Asn Pro Cys Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr
50 55 60

gaa gaa aac agt ccg cgt gcg ccg cag tat gtc ttt gaa gca ggc gta 240
Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val
65 70 75 80

ccg gta ttc ggc gtt tgc tat ggc atg cag acc atg gca atg cag ttg 288
Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Ala Met Gln Leu
85 90 95

ggc ggt cac gtt gaa gcc tct aac gaa cgt gaa ttt ggc tac gcg cag 336
Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln
100 105 110

gtt gaa gtc gta aac gac agc gca ctg gtt cgc ggt atc gaa gat gcg 384
Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala
115 120 125

ctg acc gca gac ggt aaa ccg ctg ctc gat gtc tgg atg agc cac ggc 432
Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly
130 135 140

gat aaa gtt acc gct att ccg tcc gac ttc atc acc gta gcc agc acc 480
Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Ser Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr
145 150 155 160

gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat 528
Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr
165 170 175

```



ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt acg cgc Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg 180 185 190	576
atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp 195 200 205	624
acg cca gcg aaa att atc gac gat gct gta gct cgc atc cgc gag cag Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln 210 215 220	672
gta ggc gac gat aaa gtc atc ctc ggc ctc tct ggt ggt gtg gat tcc Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 225 230 235 240	720
tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aaa aac ctg act Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr 245 250 255	768
tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln 260 265 270	816
gtt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val 275 280 285	864
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro 290 295 300	912
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp 305 310 315 320	960
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr 325 330 335	1008
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala 340 345 350	1056
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met 355 360 365	1104
aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val 370 375 380	1152
cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg 385 390 395 400	1200
cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val 405 410 415	1248
aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gac gcc atc ttc att Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile 420 425 430	1296
gaa gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc	1344

Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

act gtg ttc ctg ccg gta cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt 1392  
 Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt 1440  
 Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt 1488  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat 1536  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga 1578  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 4  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<400> 4  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15

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

Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45

Phe Asn Pro Cys Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60

Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Ala Met Gln Leu  
 85 90 95

Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln  
 100 105 110

Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala  
 115 120 125

Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly  
 130 135 140

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

Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
 165 170 175

Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg  
 180 185 190

Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
 195 200 205

Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
 210 215 220

Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
 225 230 235 240

Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr  
 245 250 255

Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
 260 265 270

Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285

Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro  
 290 295 300

Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp  
 305 310 315 320

Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335

Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350

His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365

Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380

Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415

Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430

Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

ES 2 476 425 T3

	<210>	5		
	<211>	1578		
	<212>	ADN		
5	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Secuencia artificial		
	<220>			
10	<221>	CDS		
	<222>	(1)..(1575)		
	<223>	Secuencia de aminoácidos del mutante F12 de aminasa XMP		
	<400>	5		
	atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt			48
	Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly			
	1 5 10 15			
	tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt			96
	Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val			
	20 25 30			
	tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac			144
	Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp			
	35 40 45			
	ttc aat cca agc ggc att att ctt tcc ggc ggc ccg gaa agt act act			192
	Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr			
	50 55 60			
	gaa gaa aac agt ccg cgt gcg ccg cag tat gtc ttt gaa gca ggc gta			240
	Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val			
	65 70 75 80			
	ccg gta ttc ggc gtt tgc tat ggc atg cag acc atg gta atg cag ttg			288
	Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu			
	85 90 95			
	ggc ggt cac gtt gaa gcc tot aac gaa cgt gaa ttt ggc tac gcg cag			336
	Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln			
	100 105 110			
	gtt gaa gtc gta aac gac agc gca ctg gtt cgc ggt atc gaa gat gcg			384
	Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala			
	115 120 125			
	ctg acc gca gac ggt aaa ccg ctg ctc gat gtc tgg atg agc cac ggc			432
	Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly			
	130 135 140			
	gat aaa gtt acc gct att ccg ccc gac ttc atc acc gta gcc agc acc			480
	Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Pro Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr			
	145 150 155 160			
	gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat			528
	Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr			
	165 170 175			
	ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt atg cgc			576
	Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg			
	180 185 190			
	atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg			624

Met	Leu	Glu	Arg	Phe	Val	Arg	Asp	Ile	Cys	Gln	Cys	Glu	Ala	Leu	Trp		
		195					200					205					
acg	cca	gcg	aaa	att	atc	gac	gat	gct	gta	gct	cgc	atc	cgc	gag	cag		672
Thr	Pro	Ala	Lys	Ile	Ile	Asp	Asp	Ala	Val	Ala	Arg	Ile	Arg	Glu	Gln		
	210					215					220						
gta	ggc	gac	gat	aaa	gtc	atc	ctc	ggc	ctc	tct	ggt	ggt	gtg	gat	tcc		720
Val	Gly	Asp	Asp	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Ser		
225					230					235					240		
tcc	gta	acc	gca	atg	ctg	ctg	cac	cgc	gct	atc	ggt	aaa	aac	ctg	act		768
Ser	Val	Thr	Ala	Met	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Ile	Gly	Lys	Asn	Leu	Thr		
				245					250					255			
tgc	gta	ttc	gtc	gac	aac	ggc	ctg	ctg	cgc	ctc	aac	gaa	gca	gag	cag		816
Cys	Val	Phe	Val	Asp	Asn	Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Ala	Glu	Gln		
			260				265						270				
gtt	ctg	gat	atg	ttt	ggc	gat	cac	ttt	ggt	ctt	aac	att	gtt	cac	gta		864
Val	Leu	Asp	Met	Phe	Gly	Asp	His	Phe	Gly	Leu	Asn	Ile	Val	His	Val		
	275					280						285					
ccg	gca	gaa	gat	cgc	ttc	ctg	tca	gcg	ctg	gct	ggc	gaa	aac	gat	ccg		912
Pro	Ala	Glu	Asp	Arg	Phe	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Asp	Pro		
	290					295					300						
gaa	gca	aaa	cgt	aaa	atc	atc	ggt	cgc	gtt	ttc	gtt	gaa	gta	ttc	gat		960
Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Ile	Ile	Gly	Arg	Val	Phe	Val	Glu	Val	Phe	Asp		
305					310					315					320		
gaa	gaa	gcg	ctg	aaa	ctg	gaa	gac	gtg	aag	tgg	ctg	gcg	cag	ggc	acc		1008
Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Trp	Leu	Ala	Gln	Gly	Thr		
				325					330					335			
atc	tac	cct	gac	gtt	atc	gaa	tct	gcg	gcg	tct	gca	acc	ggt	aaa	gca		1056
Ile	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Lys	Ala		
			340					345					350				
cac	gtc	atc	aaa	tct	cac	cac	aac	gtg	ggc	ggc	ctg	ccg	aaa	gag	atg		1104
His	Val	Ile	Lys	Ser	His	His	Asn	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Met		
			355				360						365				
aag	atg	ggc	ctg	gtt	gaa	ccg	ctg	aaa	gag	ctg	ttc	aaa	gac	gaa	gtg		1152
Lys	Met	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Leu	Phe	Lys	Asp	Glu	Val		
	370					375					380						
cgt	aag	att	ggt	ctg	gag	ctg	ggc	ctg	ccg	tac	gac	atg	ctg	tac	cgt		1200
Arg	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Leu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Asp	Met	Leu	Tyr	Arg		
385				390						395					400		
cac	ccg	ttc	ccg	gga	cca	ggc	ctt	ggc	gtt	cgt	gtt	ctg	ggt	gaa	gtg		1248
His	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Gly	Glu	Val		
				405					410					415			
aag	aaa	gag	tac	tgt	gac	ctg	ctg	cgc	cgt	gct	gac	gcc	atc	ttc	att		1296
Lys	Lys	Glu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala	Ile	Phe	Ile		
			420					425					430				
gaa	gaa	ctg	cgt	aaa	gcg	gac	ctg	tac	gac	aaa	gtc	agc	cag	gcg	ttc		1344
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Ala	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Val	Ser	Gln	Ala	Phe		
		435					440					445					
act	gtg	ttc	ctg	ccg	gta	cgt	tcc	gtt	ggc	gta	atg	ggc	gat	ggt	cgt		1392
Thr	Val	Phe	Leu	Pro	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Met	Gly	Asp	Gly	Arg		

450	455	460	
aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt			1440
Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe			
465	470	475	480
atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt			1488
Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val			
	485	490	495
tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat			1536
Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr			
	500	505	510
gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa			1578
Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu			
	515	520	525

<210> 6

<211> 525

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 6

Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly
1 5 10 15

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

Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp
35 40 45

Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr
50 55 60

Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val
65 70 75 80

Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu
85 90 95

Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln
100 105 110

Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala
115 120 125

Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly
130 135 140

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

Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr
165 170 175

Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg
180 185 190

Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp
195 200 205

Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln
---

210		215		220
Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser				
225		230		240
Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr				
		245		255
Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln				
		260		270
Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val				
		275		285
Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro				
		290		300
Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp				
305		310		320
Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr				
		325		335
Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala				
		340		350
His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met				
		355		365
Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val				
		370		380
Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg				
385		390		400
His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val				
		405		415
Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile				
		420		430
Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe				
		435		445
Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg				
		450		460
Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe				
465		470		480
Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val				
		485		495
Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr				
		500		510
Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu				
		515		525
				520

<210> 7  
 <211> 1578  
 <212> ADN  
 <213>

5

Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<220>

5

<221> CDS

<222> (1)..(1575)

<223> Secuencia de aminoácidos del mutante F63 de aminosasa XMP

```

<400>      7
atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt      48
Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly
  1                    5                    10                    15

tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt      96
Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val
                20                    25                    30

tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac      144
Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp
                35                    40                    45

ttc aat cca agc ggc att att ctt tcc ggc ggc ccg gaa agt act act      192
Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr
                50                    55                    60

gaa gaa aac agt ccg cgt gcg ccg cag tat gtc ttt gaa gca ggc gta      240
Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val
  65                    70                    75                    80

ccg gta ttc ggc gtt tgc tat ggc atg cag acc atg gta atg cag ttg      288
Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu
                85                    90                    95

ggc ggt cac gtt gaa gcc tct aac gaa cgt gaa ttt ggc tac gcg cag      336
Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln
                100                    105                    110

gct gaa gtc gta aac gac agc gca ctg gtt cgc ggt atc gaa gat gcg      384
Ala Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala
                115                    120                    125

ctg acc gca gac ggt aaa ccg ctg ctc gat gtc tgg atg agc cac ggc      432
Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly
                130                    135                    140

gat aaa gtt acc gct att ccg tcc gac ttc atc acc gta gcc agc acc      480
Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Ser Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr
                145                    150                    155

gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat      528
Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr
                165                    170                    175

ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt acg cgc      576
Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg
                180                    185                    190

atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg      624
Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp
                195                    200                    205

acg cca gcg aaa att atc gac gat gct gta gct cgc atc cgc gag cag      672
Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln
    
```



ES 2 476 425 T3

210	215	220	
gta ggc gac gat aaa gtc atc ctc ggc ctc tct ggt ggt gtg gat tcc Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 225 230 235 240			720
tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aaa aac ctg act Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr 245 250 255			768
tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln 260 265 270			816
gtt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val 275 280 285			864
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro 290 295 300			912
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp 305 310 315 320			960
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr 325 330 335			1008
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala 340 345 350			1056
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met 355 360 365			1104
aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val 370 375 380			1152
cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg 385 390 395 400			1200
cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val 405 410 415			1248
aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gac gcc atc ttc att Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile 420 425 430			1296
gaa gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe 435 440 445			1344
act gtg ttc ctg ccg gta cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg 450 455 460			1392
aag tat ggc tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt Lys Tyr Gly Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe 465 470 475 480			1440

atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt 1488  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat 1536  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga 1578  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 8

<211> 525

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 8

Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15

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

Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45

Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60

Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu  
 85 90 95

Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln  
 100 105 110

Ala Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala  
 115 120 125

Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly  
 130 135 140

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

Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
 165 170 175

Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg  
 180 185 190

Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
 195 200 205

Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
 210 215 220

Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
 225 230 235 240

Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr  
 245 250 255

Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
 260 265 270

Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285

Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro  
 290 295 300

Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp  
 305 310 315 320

Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335

Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350

His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365

Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380

Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415

Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430

Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

Lys Tyr Gly Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 9  
 <211> 1578  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de G3-1

10 <220>  
 <221> CDS

ES 2 476 425 T3

<222> (1)..(1575)

<223> Aminoácido de G3-1

<400> 9

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

tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aga aac ctg act	768
Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Arg Asn Leu Thr	
245 250 255	
tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag	816
Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln	
260 265 270	
gtt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta	864
Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val	
275 280 285	
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg	912
Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro	
290 295 300	
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat	960
Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp	
305 310 315 320	
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc	1008
Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr	
325 330 335	
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca	1056
Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala	
340 345 350	
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg	1104
His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met	
355 360 365	
aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg	1152
Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val	
370 375 380	
cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt	1200
Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg	
385 390 395 400	
cac ccg ttc ccg gga cca ggc ott ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg	1248
His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val	
405 410 415	
aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gac gcc atc ttc att	1296
Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile	
420 425 430	
gaa gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc	1344
Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe	
435 440 445	
act gtg ttc ctg ccg ata cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt	1392
Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg	
450 455 460	
aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt	1440
Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe	
465 470 475 480	
atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt	1488
Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val	
485 490 495	

tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat 1536  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
                   500                                  505                                  510

gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga 1578  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
                   515                                  520                                  525

<210> 10  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<400> 10  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
                   20                                  25                                  30  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
                   35                                  40                                  45  
 Phe Asn Pro Cys Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
   50                                  55                                  60  
 Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Ala Met Gln Leu  
                   85                                  90                                  95  
 Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln  
                   100                                  105                                  110  
 Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala  
   115                                  120                                  125  
 Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly  
   130                                  135                                  140  
 Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Ser Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr  
   145                                  150                                  155                                  160  
 Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
                   165                                  170  
 Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg  
                   180                                  185                                  190  
 Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
   195                                  200                                  205  
 Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
   210                                  215                                  220  
 Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
   225                                  230                                  235                                  240  
 Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Arg Asn Leu Thr  
                   245                                  250                                  255  
 Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
                   260                                  265                                  270

Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285

Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro  
 290 295 300

Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp  
 305 310 315 320

Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335

Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350

His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365

Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380

Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415

Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430

Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 11  
 <211> 1578  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de F12-1

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1575)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de F12-1





tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln 260 265 270	816
gtt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val 275 280 285	864
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro 290 295 300	912
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp 305 310 315 320	960
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr 325 330 335	1008
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala 340 345 350	1056
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met 355 360 365	1104
aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val 370 375 380	1152
cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg 385 390 395 400	1200
cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val 405 410 415	1248
aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gat gcc atc ttc att Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile 420 425 430	1296
gag gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe 435 440 445	1344
act gtg ttc ctg ccg ata cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg 450 455 460	1392
aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe 465 470 475 480	1440
atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val 485 490 495	1488
tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr 500 505 510	1536
gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga	1578

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

- <210> 12
- <211> 525
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

<400> 12  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45  
 Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60  
 Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80  
 Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu  
 85 90 95  
 Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln  
 100 105 110  
 Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala  
 115 120 125  
 Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly  
 130 135 140  
 Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Pro Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
 165 170 175  
 Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg  
 180 185 190  
 Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
 195 200 205  
 Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
 210 215 220  
 Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
 260 265 270  
 Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285  
 Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro

```

                290                      295                      300
Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp
305                      310                      315                      320
Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr
                      325                      330                      335
Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala
                      340                      345                      350
His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met
                      355                      360                      365
Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val
                      370                      375                      380
Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg
385                      390                      395                      400
His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val
                      405                      410                      415
Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile
                      420                      425                      430
Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe
                      435                      440                      445
Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg
450                      455                      460
Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe
465                      470                      475                      480
Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val
                      485                      490                      495
Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr
                    500                      505                      510
Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu
                    515                      520                      525

```

<210> 13  
 <211> 1578  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de F63-1

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1575)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de F63-1

```

<400> 13
atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt
Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly
  1                      5                      10                      15

```

ES 2 476 425 T3

tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val 20 25 30	96
tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp 35 40 45	144
ttc aat cca agc ggc att att ctt tcc ggc ggc ccg gaa agt act act Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr 50 55 60	192
gaa gaa aac agt ccg cgt gcg ccg cag tat gtc ttt gaa gca ggc gta Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val 65 70 75 80	240
ccg gta ttc ggc gtt tgc tat ggc atg cag acc atg gta atg cag ttg Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu 85 90 95	288
ggc ggt cac att gaa gcc tct aac gaa cgt gaa ttt ggc tac gcg cag Gly Gly His Ile Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln 100 105 110	336
gct gaa gtc gta aac gac agc gca ctg gtt cgc ggt atc gaa gat gcg Ala Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala 115 120 125	384
ctg acc gca gac ggt aaa ccg ctg ctc gat gtc tgg atg agc cac ggc Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly 130 135 140	432
gat aaa gtt acc gct att ccg tcc gac ttc atc acc gta gcc agc acc Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Ser Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr 145 150 155 160	480
gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr 165 170 175	528
ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt acg cgc Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg 180 185 190	576
atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp 195 200 205	624
acg cca gcg aaa att atc gac gat gct gta gct cgc atc cgc gag cag Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln 210 215 220	672
gta ggc gac gat aaa gtt atc ctc ggc ctc tct ggt ggt gtg gat tcc Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 225 230 235 240	720
tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aaa aac ctg act Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr 245 250 255	768
tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln 260 265 270	816
gtt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta	864

Val	Leu	Asp	Met	Phe	Gly	Asp	His	Phe	Gly	Leu	Asn	Ile	Val	His	Val		
		275					280					285					
ccg	gca	gaa	gat	cgc	ttc	ctg	tca	gcg	ctg	gct	ggc	gaa	aac	gat	ccg		912
Pro	Ala	Glu	Asp	Arg	Phe	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Asp	Pro		
		290				295					300						
gaa	gca	aaa	cgt	aaa	atc	atc	ggc	cgc	ggt	ttc	ggt	gaa	gta	ttc	gat		960
Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Ile	Ile	Gly	Arg	Val	Phe	Val	Glu	Val	Phe	Asp		
		305			310					315					320		
gaa	gaa	gcg	ctg	aaa	ctg	gaa	gac	gtg	aag	tgg	ctg	gcg	cag	ggc	acc		1008
Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Trp	Leu	Ala	Gln	Gly	Thr		
				325					330					335			
atc	tac	cct	gac	ggt	atc	gaa	tct	gcg	gcg	tct	gca	acc	ggt	aaa	gca		1056
Ile	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Lys	Ala		
			340					345					350				
cac	gtc	atc	aaa	tct	cac	cac	aac	gtg	ggc	ggc	ctg	ccg	aaa	gag	atg		1104
His	Val	Ile	Lys	Ser	His	His	Asn	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Met		
			355				360					365					
aag	atg	ggc	ctg	ggt	gaa	ccg	ctg	aaa	gag	ctg	ttc	aaa	gac	gaa	gtg		1152
Lys	Met	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Leu	Phe	Lys	Asp	Glu	Val		
		370				375					380						
cgt	aag	att	ggt	ctg	gag	ctg	ggc	ctg	ccg	tac	gac	atg	ctg	tac	cgt		1200
Arg	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Leu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Asp	Met	Leu	Tyr	Arg		
					390					395					400		
cac	ccg	ttc	ccg	gga	cca	ggc	ctt	ggc	ggt	cgt	ggt	ctg	ggt	gaa	gtg		1248
His	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Gly	Glu	Val		
				405				410						415			
aag	aaa	gag	tac	tgt	gac	ctg	ctg	cgc	cgt	gct	gac	gcc	atc	ttc	att		1296
Lys	Lys	Glu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala	Ile	Phe	Ile		
				420				425					430				
gaa	gaa	ctg	cgt	aaa	gcg	gac	ctg	tac	gac	aaa	gtc	agc	cag	gcg	ttc		1344
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Ala	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Val	Ser	Gln	Ala	Phe		
				435			440					445					
act	gtg	ttc	ctg	ccg	ata	cgt	tcc	ggt	ggc	gta	atg	ggc	gat	ggt	cgt		1392
Thr	Val	Phe	Leu	Pro	Ile	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Met	Gly	Asp	Gly	Arg		
						455					460						
aag	tat	ggc	tgg	ggt	gtc	tct	ctg	cgt	gct	gtc	gaa	acc	atc	gac	ttt		1440
Lys	Tyr	Gly	Trp	Val	Val	Ser	Leu	Arg	Ala	Val	Glu	Thr	Ile	Asp	Phe		
					470					475					480		
atg	acc	gca	cac	tgg	gcg	cat	ctg	ccg	tac	gat	ttc	ctc	ggt	cgc	ggt		1488
Met	Thr	Ala	His	Trp	Ala	His	Leu	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val		
				485				490						495			
tcc	aac	cgc	att	atc	aat	gaa	gtg	aac	ggt	att	tcc	cgc	gtg	gtg	tat		1536
Ser	Asn	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Val	Asn	Gly	Ile	Ser	Arg	Val	Val	Tyr		
				500				505					510				
gac	atc	agc	ggc	aag	ccg	cca	gct	acc	att	gag	tgg	gaa			tga		1578
Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	Pro	Pro	Ala	Thr	Ile	Glu	Trp	Glu					
			515				520					525					

ES 2 476 425 T3

<211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<400> 14

```

Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly
 1           5           10           15

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

Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp
           35           40           45

Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr
           50           55           60

Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val
 65           70           75           80

Pro Val Phe Gly Val Cys Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu
           85           90           95

Gly Gly His Ile Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln
           100          105          110

Ala Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala
 115          120          125

Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly
 130          135          140

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

Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr
           165          170          175

Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg
           180          185          190

Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp
 195          200          205

Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln
 210          215          220

Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
 225          230          235          240

Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr
           245          250          255

Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln
           260          265          270

Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val
 275          280          285

Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro
 290          295          300

Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp
 305          310          315          320
    
```

Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335  
 Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350  
 His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365  
 Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430  
 Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460  
 Lys Tyr Gly Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 15  
 <211> 1578  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de G1C

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1575)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de G1C

<400> 15  
 atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt 48  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15  
 tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt 96  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30  
 tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac 144

Tyr	Cys	Glu	Leu	Trp	Ala	Trp	Asp	Val	Thr	Glu	Ala	Gln	Ile	Arg	Asp		
		35					40					45					
ttc	aat	cca	agc	ggc	att	att	ctt	tcc	ggc	ggc	ccg	gaa	agt	act	act		192
Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Gly	Gly	Pro	Glu	Ser	Thr	Thr		
	50					55					60						
gaa	gaa	aac	agt	ccg	cgt	gcg	ccg	cag	tat	gtc	ttt	gaa	gca	ggc	gta		240
Glu	Glu	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Pro	Gln	Tyr	Val	Phe	Glu	Ala	Gly	Val		
	65				70					75					80		
ccg	gta	ttc	ggc	ggt	gca	tat	ggc	atg	cag	acc	atg	gca	atg	cag	ttg		288
Pro	Val	Phe	Gly	Val	Ala	Tyr	Gly	Met	Gln	Thr	Met	Ala	Met	Gln	Leu		
				85					90					95			
ggc	ggt	cac	ggt	gaa	gcc	tct	aac	gaa	cgt	gaa	ttt	ggc	tac	gcg	cag		336
Gly	Gly	His	Val	Glu	Ala	Ser	Asn	Glu	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ala	Gln		
			100					105					110				
ggt	gaa	gtc	gta	aac	gac	agc	gca	ctg	ggt	cgc	ggt	atc	gaa	gat	gcg		384
Val	Glu	Val	Val	Asn	Asp	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Ile	Glu	Asp	Ala		
			115					120					125				
ctg	acc	gca	gac	ggt	aaa	ccg	ctg	ctc	gat	gtc	tgg	atg	agc	cac	ggc		432
Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Ser	His	Gly		
			130			135						140					
gat	aaa	ggt	acc	gct	att	ccg	tcc	gac	ttc	atc	acc	gta	gcc	agc	acc		480
Asp	Lys	Val	Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Thr		
					150					155					160		
gaa	agc	tgc	ccg	ttt	gcc	att	atg	gct	aac	gaa	gaa	aaa	cgc	ttc	tat		528
Glu	Ser	Cys	Pro	Phe	Ala	Ile	Met	Ala	Asn	Glu	Glu	Lys	Arg	Phe	Tyr		
				165					170					175			
ggc	gta	cag	ttc	cac	ccg	gaa	gtg	act	cat	acc	cgc	cag	ggt	atg	cgc		576
Gly	Val	Gln	Phe	His	Pro	Glu	Val	Thr	His	Thr	Arg	Gln	Gly	Met	Arg		
			180					185						190			
atg	ctg	gag	cgt	ttt	gtg	cgt	gat	atc	tgc	cag	tgt	gaa	gcc	ctg	tgg		624
Met	Leu	Glu	Arg	Phe	Val	Arg	Asp	Ile	Cys	Gln	Cys	Glu	Ala	Leu	Trp		
			195				200						205				
acg	cca	gcg	aaa	att	atc	gac	gat	gct	gta	gct	cgc	atc	cgc	gag	cag		672
Thr	Pro	Ala	Lys	Ile	Ile	Asp	Asp	Ala	Val	Ala	Arg	Ile	Arg	Glu	Gln		
			210			215						220					
gta	ggc	gac	gat	aaa	gtc	atc	ctc	ggc	ctc	tct	ggt	ggt	gtg	gat	tcc		720
Val	Gly	Asp	Asp	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Ser		
					230					235					240		
tcc	gta	acc	gca	atg	ctg	ctg	cac	cgc	gct	atc	ggt	aaa	aac	ctg	act		768
Ser	Val	Thr	Ala	Met	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Ile	Gly	Lys	Asn	Leu	Thr		
				245					250					255			
tgc	gta	ttc	gtc	gac	aac	ggc	ctg	ctg	cgc	ctc	aac	gaa	gca	gag	cag		816
Cys	Val	Phe	Val	Asp	Asn	Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Ala	Glu	Gln		
			260					265					270				
ggt	ctg	gat	atg	ttt	ggc	gat	cac	ttt	ggt	ctt	aac	att	ggt	cac	gta		864
Val	Leu	Asp	Met	Phe	Gly	Asp	His	Phe	Gly	Leu	Asn	Ile	Val	His	Val		
			275				280					285					
ccg	gca	gaa	gat	cgc	ttc	ctg	tca	gcg	ctg	gct	ggc	gaa	aac	gat	ccg		912
Pro	Ala	Glu	Asp	Arg	Phe	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Asp	Pro		



290	295	300	
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat			960
Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp			
305	310	315	320
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc			1008
Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr			
	325	330	335
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca			1056
Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala			
	340	345	350
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg			1104
His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met			
	355	360	365
aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg			1152
Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val			
	370	375	380
cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt			1200
Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg			
	385	390	400
cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg			1248
His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val			
	405	410	415
aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gac gcc atc ttc att			1296
Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile			
	420	425	430
gaa gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc			1344
Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe			
	435	440	445
act gtg ttc ctg ccg gta cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt			1392
Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg			
	450	455	460
aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt			1440
Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe			
	465	470	480
atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt			1488
Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val			
	485	490	495
tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat			1536
Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr			
	500	505	510
gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa			1578
Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu			
	515	520	525

<210> 16  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <400> 16

5

ES 2 476 425 T3

Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15

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

Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45

Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60

Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Val Phe Gly Val Ala Tyr Gly Met Gln Thr Met Ala Met Gln Leu  
 85 90 95

Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln  
 100 105 110

Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala  
 115 120 125

Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly  
 130 135 140

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

Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
 165 170 175

Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg  
 180 185 190

Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
 195 200 205

Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
 210 215 220

Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
 225 230 235 240

Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr  
 245 250 255

Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
 260 265 270

Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285

Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro  
 290 295 300

Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp  
 305 310 315 320

Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335

Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350

His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365

Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380

Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415

Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430

Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

Thr Val Phe Leu Pro Val Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 17  
 <211> 1578  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de G3C

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1575)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de G3C

<400> 17  
 atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt 48  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15

tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt 96  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30

tac tgc gaa ttg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac 144  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45

ttc aat cca tgc ggc att att ctt tcc gcc gcc ccg gaa agt act act 192  
 Phe Asn Pro Cys Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr

ES 2 476 425 T3

50				55				60								
gaa Glu 65	gaa Glu	aac Asn	agt Ser	ccg Pro	cgt Arg	gcg Ala	ccg Pro	cag Gln	tat Tyr	gtc Val	ttt Phe	gaa Glu	gca Ala	ggc Gly	gta Val	240
ccg Pro	gta Val	ttc Phe	ggc Gly	gtt Val	gca Ala	tat Tyr	ggc Gly	atg Met	cag Gln	acc Thr	atg Met	gca Ala	atg Met	cag Gln	ttg Leu	288
ggc Gly	ggt Gly	cac His	gtt Val	gaa Glu	gcc Ala	tct Ser	aac Asn	gaa Glu	cgt Arg	gaa Glu	ttt Phe	ggc Gly	tac Tyr	gcg Ala	cag Gln	336
gta Val	gaa Glu	gtc Val	gta Val	aac Asn	gac Asp	agc Ser	gca Ala	ctg Leu	gtt Val	cgc Arg	ggt Gly	atc Ile	gaa Glu	gat Asp	gcg Ala	384
ctg Leu	acc Thr	gca Ala	gac Asp	ggt Gly	aaa Lys	ccg Pro	ctg Leu	ctc Leu	gat Asp	gtc Val	tgg Trp	atg Met	agc Ser	cac His	ggc Gly	432
gat Asp 145	aaa Lys	gtt Val	acc Thr	gct Ala	att Ile	ccg Pro	tcc Ser	gac Asp	ttc Phe	atc Ile	acc Thr	gta Val	gcc Ala	agc Ser	acc Thr	480
gaa Glu	agc Ser	tgc Cys	ccg Pro	ttt Phe	gcc Ala	att Ile	atg Met	gct Ala	aac Asn	gaa Glu	gaa Glu	aaa Lys	cgc Arg	ttc Phe	tat Tyr	528
ggc Gly	gta Val	cag Gln	ttc Phe	cac His	ccg Pro	gaa Glu	gtg Val	act Thr	cat His	acc Thr	cgc Arg	cag Gln	ggt Gly	acg Thr	cgc Arg	576
atg Met	ctg Leu	gag Glu	cgt Arg	ttt Phe	gtg Val	cgt Arg	gat Asp	atc Ile	tgc Cys	cag Gln	tgt Cys	gaa Glu	gcc Ala	ctg Leu	tgg Trp	624
acg Thr	cca Pro	gcg Ala	aaa Lys	att Ile	atc Ile	gac Asp	gat Asp	gct Ala	gta Val	gct Ala	cgc Arg	atc Ile	cgc Arg	gag Glu	cag Gln	672
gta Val 225	ggc Gly	gac Asp	gat Asp	aaa Lys	gtc Val	atc Ile	ctc Leu	ggc Gly	ctc Leu	tct Ser	ggt Gly	ggt Gly	gtg Val	gat Asp	tcc Ser	720
tcc Ser	gta Val	acc Thr	gca Ala	atg Met	ctg Leu	ctg Leu	cac His	cgc Arg	gct Ala	atc Ile	ggt Gly	aga Arg	aac Asn	ctg Leu	act Thr	768
tgc Cys	gta Val	ttc Phe	gtc Val	gac Asp	aac Asn	ggc Gly	ctg Leu	ctg Leu	cgc Arg	ctc Leu	aac Asn	gaa Glu	gca Ala	gag Glu	cag Gln	816
gta Val	ctg Leu	gat Asp	atg Met	ttt Phe	ggc Gly	gat Asp	cac His	ttt Phe	ggt Gly	ctt Leu	aac Asn	att Ile	gtt Val	cac His	gta Val	864
ccg Pro	gca Ala	gaa Glu	gat Asp	cgc Arg	ttc Phe	ctg Leu	tca Ser	gcg Ala	ctg Leu	gct Ala	ggc Gly	gaa Glu	aac Asn	gat Asp	ccg Pro	912
gaa Glu 305	gca Ala	aaa Lys	cgt Arg	aaa Lys	atc Ile	atc Ile	ggt Gly	cgc Arg	gtt Val	ttc Phe	gtt Val	gaa Glu	gta Val	ttc Phe	gat Asp	960

gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc 1008  
 Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335

atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca 1056  
 Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350

cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg 1104  
 His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365

aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg 1152  
 Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380

cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt 1200  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400

cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg 1248  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415

aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg ccg cgt gct gac gcc atc ttc att 1296  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430

gaa gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc 1344  
 Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

act gtg ttc ctg ccg ata cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt 1392  
 Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt 1440  
 Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt 1488  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat 1536  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga 1578  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 18  
 <211> 525  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 18  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30

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

370 375 380  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430  
 Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445  
 Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460  
 Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 19  
 <211> 1578  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de F12C

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1575)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de F12C

<400> 19 48  
 atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15  
 tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt 96  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30  
 tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac 144  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45  
 ttc aat cca agc ggc att att ctt tcc ggc ggc ccg gaa agt act act 192  
 Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60  
 gaa gaa aac agt ccg cgt gcg ccg cag tat gtc ttt gaa gca ggc gta 240  
 Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80

ccg gta ttc ggc gtt gca tat ggc atg cag acc atg gta atg cag ttg Pro Val Phe Gly Val Ala Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu 85 90 95	288
ggc ggt cac gtt gaa gcc tct aac gaa cgt gaa ttt ggc tac gcg cag Gly Gly His Val Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln 100 105 110	336
ggt gaa gtc gta aac gac agc gca ctg gtt cgc ggt atc gaa gat gcg Val Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala 115 120 125	384
ctg acc gca gac ggt aaa ccg ctg ctc gat gtc tgg atg agc cac ggc Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly 130 135 140	432
gat aaa gtt acc gct att ccg ccc gac ttc atc acc gta gcc agc acc Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Pro Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr 145 150 155 160	480
gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr 165 170 175	528
ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt atg cgc Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Met Arg 180 185 190	576
atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp 195 200 205	624
acg cca gcg aaa att atc gac gat gct gta gct cgc atc cgc gag cag Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln 210 215 220	672
gta ggc gac gat aaa gtc atc ctc ggc ctc tct ggt ggt gtg gat tcc Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 225 230 235 240	720
tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aaa aac ctg act Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr 245 250 255	768
tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln 260 265 270	816
ggt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val 275 280 285	864
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro 290 295 300	912
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp 305 310 315 320	960
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr 325 330 335	1008



atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca 1056  
 Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350  
 cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg 1104  
 His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365  
 aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg 1152  
 Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380  
 cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt 1200  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg 1248  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415  
 aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gat gcc atc ttc att 1296  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430  
 gag gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc 1344  
 Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445  
 act gtg ttc ctg ccg ata cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt 1392  
 Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460  
 aag tat gac tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt 1440  
 Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480  
 atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt 1488  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495  
 tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat 1536  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510  
 gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga 1578  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 20  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<400> 20  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45  
 Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr

ES 2 476 425 T3

50						55									60
Glu	Glu	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Pro	Gln	Tyr	Val	Phe	Glu	Ala	Gly	Val
65					70					75					80
Pro	Val	Phe	Gly	Val	Ala	Tyr	Gly	Met	Gln	Thr	Met	Val	Met	Gln	Leu
				85					90					95	
Gly	Gly	His	Val	Glu	Ala	Ser	Asn	Glu	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ala	Gln
			100					105					110		
Val	Glu	Val	Val	Asn	Asp	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Ile	Glu	Asp	Ala
		115					120					125			
Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Ser	His	Gly
	130					135					140				
Asp	Lys	Val	Thr	Ala	Ile	Pro	Pro	Asp	Phe	Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Thr
145					150					155					160
Glu	Ser	Cys	Pro	Phe	Ala	Ile	Met	Ala	Asn	Glu	Glu	Lys	Arg	Phe	Tyr
				165					170					175	
Gly	Val	Gln	Phe	His	Pro	Glu	Val	Thr	His	Thr	Arg	Gln	Gly	Met	Arg
			180					185						190	
Met	Leu	Glu	Arg	Phe	Val	Arg	Asp	Ile	Cys	Gln	Cys	Glu	Ala	Leu	Trp
		195					200					205			
Thr	Pro	Ala	Lys	Ile	Ile	Asp	Asp	Ala	Val	Ala	Arg	Ile	Arg	Glu	Gln
		210				215					220				
Val	Gly	Asp	Asp	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Ser
225					230					235					240
Ser	Val	Thr	Ala	Met	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Ile	Gly	Lys	Asn	Leu	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Phe	Val	Asp	Asn	Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Ala	Glu	Gln
			260					265					270		
Val	Leu	Asp	Met	Phe	Gly	Asp	His	Phe	Gly	Leu	Asn	Ile	Val	His	Val
		275					280					285			
Pro	Ala	Glu	Asp	Arg	Phe	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Asp	Pro
		290				295					300				
Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Ile	Ile	Gly	Arg	Val	Phe	Val	Glu	Val	Phe	Asp
305					310					315					320
Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Trp	Leu	Ala	Gln	Gly	Thr
				325					330					335	
Ile	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Lys	Ala
			340					345					350		
His	Val	Ile	Lys	Ser	His	His	Asn	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Met
		355					360					365			
Lys	Met	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Leu	Phe	Lys	Asp	Glu	Val
		370				375					380				
Arg	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Leu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Asp	Met	Leu	Tyr	Arg
385					390					395					400

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415

Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430

Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445

Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460

Lys Tyr Asp Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480

Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495

Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510

Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 21  
 <211> 1578  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de ADN de F63C

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1575)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de F63C

<400> 21  
 atg acg gaa aac att cat aag cat cgc atc ctc att ctg gac ttc ggt 48  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15

tct cag tac act caa ctg gtt gcg cgc cgc gtg cgt gag ctg ggt gtt 96  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30

tac tgc gaa ctg tgg gcg tgg gat gtg aca gaa gca caa att cgt gac 144  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45

ttc aat cca agc ggc att att ctt tcc ggc ggc ccg gaa agt act act 192  
 Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60

gaa gaa aac agt ccg cgt gcg ccg cag tat gtc ttt gaa gca ggc gta 240  
 Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80

ccg gta ttc ggc gtt gca tat ggc atg cag acc atg gta atg cag ttg 288  
 Pro Val Phe Gly Val Ala Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu  
 85 90 95

ggc ggt cac att gaa gcc tct aac gaa cgt gaa ttt ggc tac gcg cag Gly Gly His Ile Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln 100 105 110	336
gct gaa gtc gta aac gac agc gca ctg gtt cgc ggt atc gaa gat gcg Ala Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala 115 120 125	384
ctg acc gca gac ggt aaa ccg ctg ctc gat gtc tgg atg agc cac ggc Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly 130 135 140	432
gat aaa gtt acc gct att ccg tcc gac ttc atc acc gta gcc agc acc Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Ser Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr 145 150 155 160	480
gaa agc tgc ccg ttt gcc att atg gct aac gaa gaa aaa cgc ttc tat Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr 165 170 175	528
ggc gta cag ttc cac ccg gaa gtg act cat acc cgc cag ggt acg cgc Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg 180 185 190	576
atg ctg gag cgt ttt gtg cgt gat atc tgc cag tgt gaa gcc ctg tgg Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp 195 200 205	624
acg cca gcg aaa att atc gac gat gct gta gct cgc atc cgc gag cag Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln 210 215 220	672
gta ggc gac gat aaa gtt atc ctc ggc ctc tct ggt ggt gtg gat tcc Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 225 230 235 240	720
tcc gta acc gca atg ctg ctg cac cgc gct atc ggt aaa aac ctg act Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr 245 250 255	768
tgc gta ttc gtc gac aac ggc ctg ctg cgc ctc aac gaa gca gag cag Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln 260 265 270	816
gtt ctg gat atg ttt ggc gat cac ttt ggt ctt aac att gtt cac gta Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val 275 280 285	864
ccg gca gaa gat cgc ttc ctg tca gcg ctg gct ggc gaa aac gat ccg Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro 290 295 300	912
gaa gca aaa cgt aaa atc atc ggt cgc gtt ttc gtt gaa gta ttc gat Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp 305 310 315 320	960
gaa gaa gcg ctg aaa ctg gaa gac gtg aag tgg ctg gcg cag ggc acc Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr 325 330 335	1008
atc tac cct gac gtt atc gaa tct gcg gcg tct gca acc ggt aaa gca Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala 340 345 350	1056
cac gtc atc aaa tct cac cac aac gtg ggc ggc ctg ccg aaa gag atg	1104

His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365  
 aag atg ggc ctg gtt gaa ccg ctg aaa gag ctg ttc aaa gac gaa gtg 1152  
 Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380  
 cgt aag att ggt ctg gag ctg ggc ctg ccg tac gac atg ctg tac cgt 1200  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 cac ccg ttc ccg gga cca ggc ctt ggc gtt cgt gtt ctg ggt gaa gtg 1248  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415  
 aag aaa gag tac tgt gac ctg ctg cgc cgt gct gac gcc atc ttc att 1296  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430  
 gaa gaa ctg cgt aaa gcg gac ctg tac gac aaa gtc agc cag gcg ttc 1344  
 Glu Glu Leu Arg Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe  
 435 440 445  
 act gtg ttc ctg ccg ata cgt tcc gtt ggc gta atg ggc gat ggt cgt 1392  
 Thr Val Phe Leu Pro Ile Arg Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gly Arg  
 450 455 460  
 aag tat ggc tgg gtt gtc tct ctg cgt gct gtc gaa acc atc gac ttt 1440  
 Lys Tyr Gly Trp Val Val Ser Leu Arg Ala Val Glu Thr Ile Asp Phe  
 465 470 475 480  
 atg acc gca cac tgg gcg cat ctg ccg tac gat ttc ctc ggt cgc gtt 1488  
 Met Thr Ala His Trp Ala His Leu Pro Tyr Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 485 490 495  
 tcc aac cgc att atc aat gaa gtg aac ggt att tcc cgc gtg gtg tat 1536  
 Ser Asn Arg Ile Ile Asn Glu Val Asn Gly Ile Ser Arg Val Val Tyr  
 500 505 510  
 gac atc agc ggc aag ccg cca gct acc att gag tgg gaa tga 1578  
 Asp Ile Ser Gly Lys Pro Pro Ala Thr Ile Glu Trp Glu  
 515 520 525

<210> 22  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<400> 22  
 Met Thr Glu Asn Ile His Lys His Arg Ile Leu Ile Leu Asp Phe Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Tyr Thr Gln Leu Val Ala Arg Arg Val Arg Glu Leu Gly Val  
 20 25 30  
 Tyr Cys Glu Leu Trp Ala Trp Asp Val Thr Glu Ala Gln Ile Arg Asp  
 35 40 45  
 Phe Asn Pro Ser Gly Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro Glu Ser Thr Thr  
 50 55 60  
 Glu Glu Asn Ser Pro Arg Ala Pro Gln Tyr Val Phe Glu Ala Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Val Phe Gly Val Ala Tyr Gly Met Gln Thr Met Val Met Gln Leu  
 85 90 95  
 Gly Gly His Ile Glu Ala Ser Asn Glu Arg Glu Phe Gly Tyr Ala Gln  
 100 105 110  
 Ala Glu Val Val Asn Asp Ser Ala Leu Val Arg Gly Ile Glu Asp Ala  
 115 120 125  
 Leu Thr Ala Asp Gly Lys Pro Leu Leu Asp Val Trp Met Ser His Gly  
 130 135 140  
 Asp Lys Val Thr Ala Ile Pro Ser Asp Phe Ile Thr Val Ala Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Cys Pro Phe Ala Ile Met Ala Asn Glu Glu Lys Arg Phe Tyr  
 165 170 175  
 Gly Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Thr Arg Gln Gly Thr Arg  
 180 185 190  
 Met Leu Glu Arg Phe Val Arg Asp Ile Cys Gln Cys Glu Ala Leu Trp  
 195 200 205  
 Thr Pro Ala Lys Ile Ile Asp Asp Ala Val Ala Arg Ile Arg Glu Gln  
 210 215 220  
 Val Gly Asp Asp Lys Val Ile Leu Gly Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Val Thr Ala Met Leu Leu His Arg Ala Ile Gly Lys Asn Leu Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Leu Asn Glu Ala Glu Gln  
 260 265 270  
 Val Leu Asp Met Phe Gly Asp His Phe Gly Leu Asn Ile Val His Val  
 275 280 285  
 Pro Ala Glu Asp Arg Phe Leu Ser Ala Leu Ala Gly Glu Asn Asp Pro  
 290 295 300  
 Glu Ala Lys Arg Lys Ile Ile Gly Arg Val Phe Val Glu Val Phe Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Ala Leu Lys Leu Glu Asp Val Lys Trp Leu Ala Gln Gly Thr  
 325 330 335  
 Ile Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ala Ala Ser Ala Thr Gly Lys Ala  
 340 345 350  
 His Val Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Glu Met  
 355 360 365  
 Lys Met Gly Leu Val Glu Pro Leu Lys Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 370 375 380  
 Arg Lys Ile Gly Leu Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Asp Met Leu Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Gly Val Arg Val Leu Gly Glu Val  
 405 410 415  
 Lys Lys Glu Tyr Cys Asp Leu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ile Phe Ile  
 420 425 430



# ES 2 476 425 T3

<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador para mutagénesis de guaA

<400> 27  
ccggatttcg gcgtgcata tggcatgcag accatg 36

10 <210> 28  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador para mutagénesis de guaA

20 <400> 28  
catggtctgc atgcatatg caacgccgaa taccgg 36

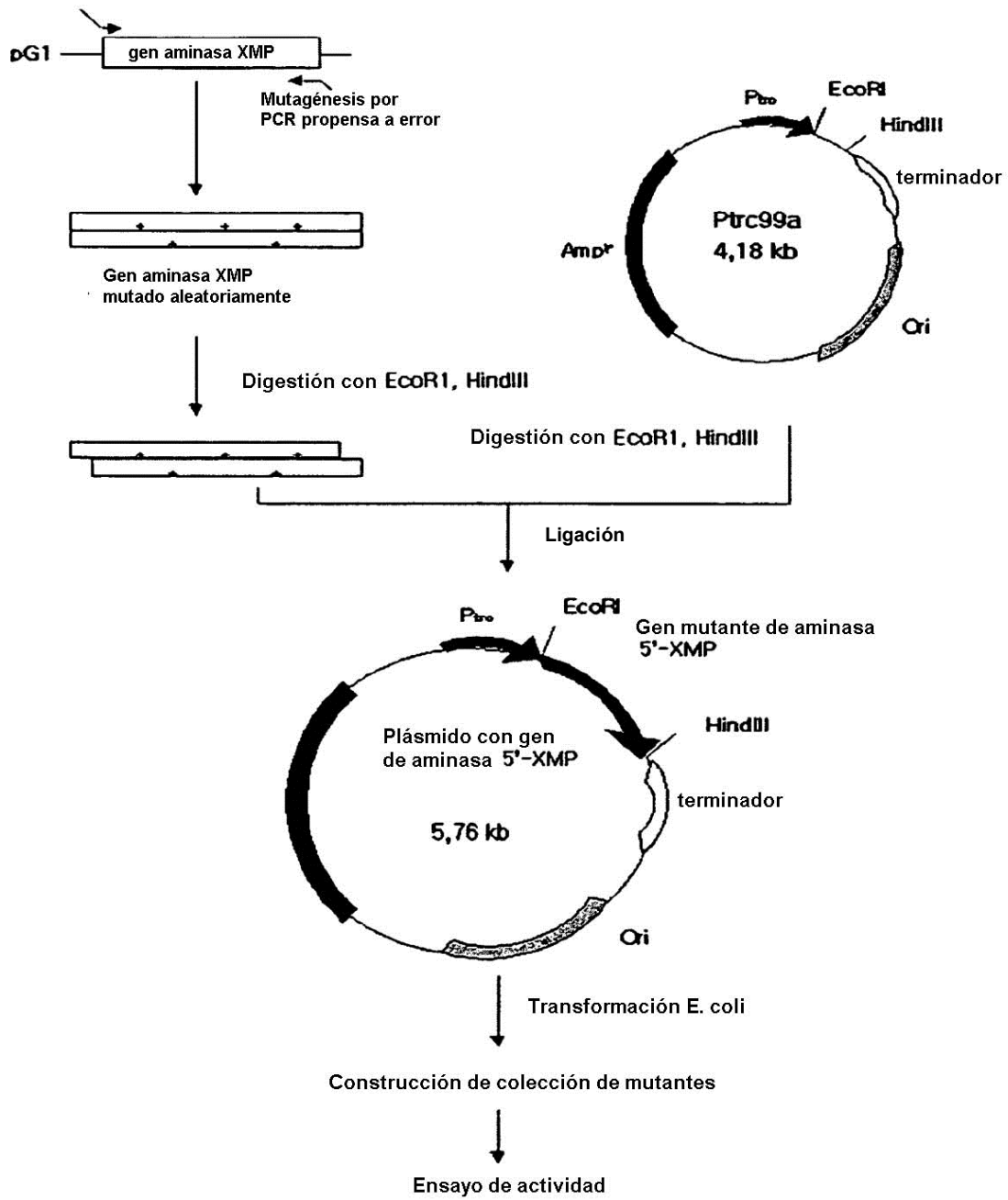


**REIVINDICACIONES**

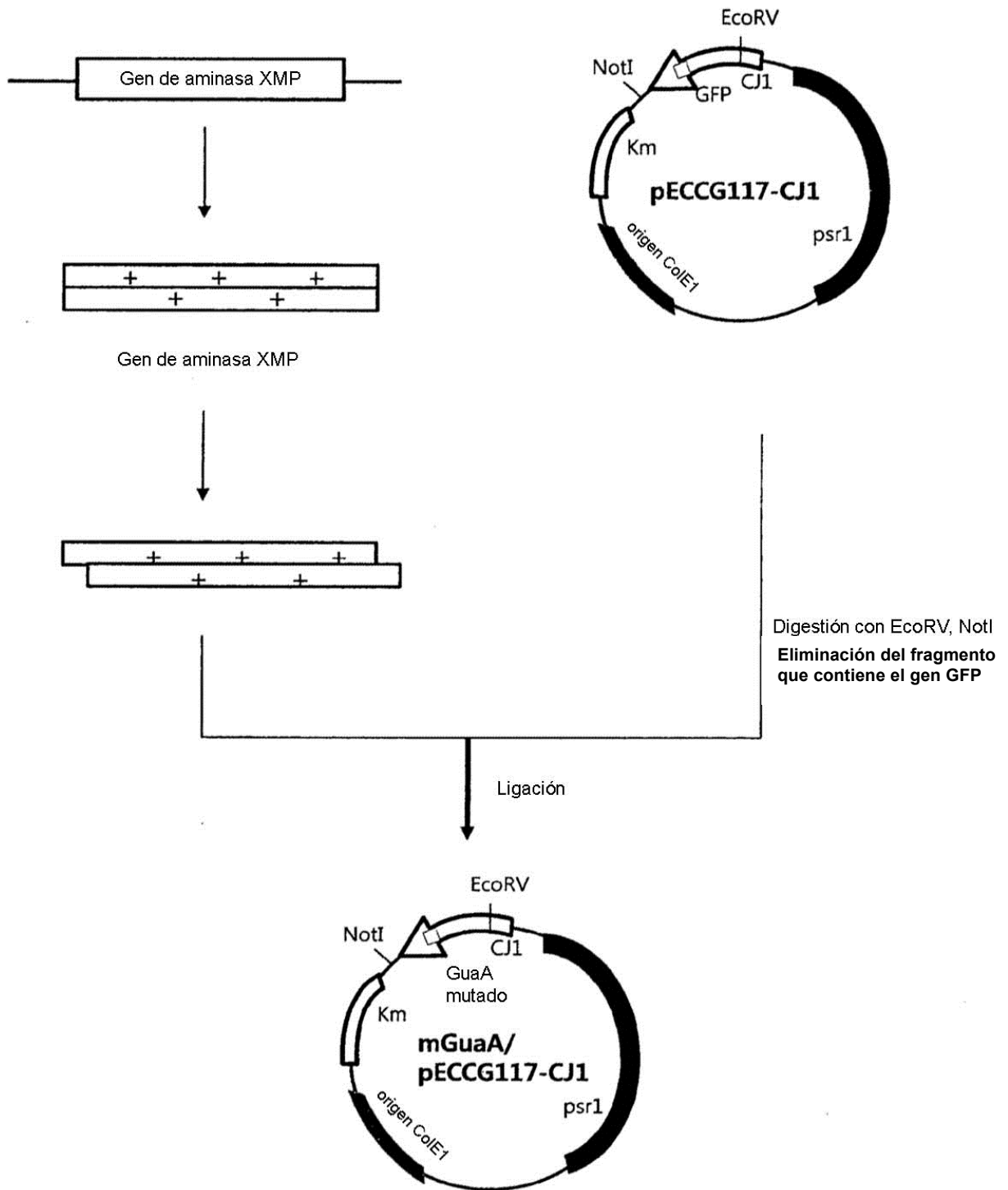
1. Un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco, preparado sustituyendo cisteína en la posición 86 de aminosasa 5'-XMP con alanina, serina o glicina, en el que la aminosasa 5'-XMP tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14.
- 5 2. El mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cisteína en la posición 86 está sustituida con alanina.
3. El mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO.: 16, 18, 20 o 22.
- 10 4. Una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de la reivindicación 1.
5. Un vector de expresión que lleva la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4.
6. Un transformante procarionta, transformado con el vector de expresión de la reivindicación 5.
7. Un procedimiento para convertir 5'-XMP en 5'-GMP, que comprende usar el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco de una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 8. Un procedimiento para preparar un mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco, que comprende sustituir un residuo cisteína en la posición 86 de una secuencia de aminoácidos de aminosasa 5'-XMP que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO.: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, con alanina, glicina o serina, donde el mutante de aminosasa 5'-XMP específico de amoníaco es sustancialmente inactivo para glutamina, pero reacciona específicamente con amoníaco para convertir 5'-XMP en 5'-GMP a una eficacia potenciada.

20

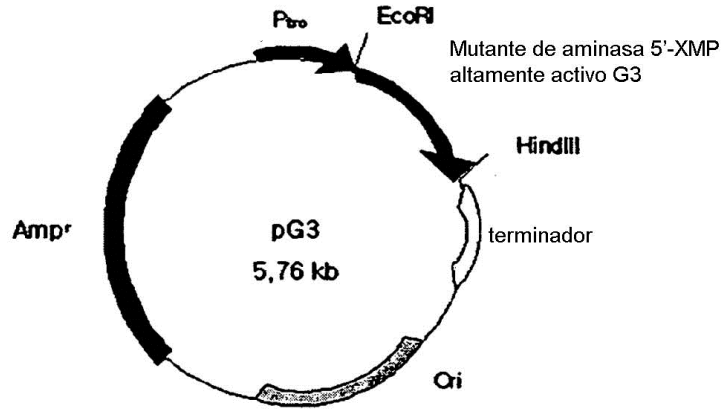
[Fig. 1]



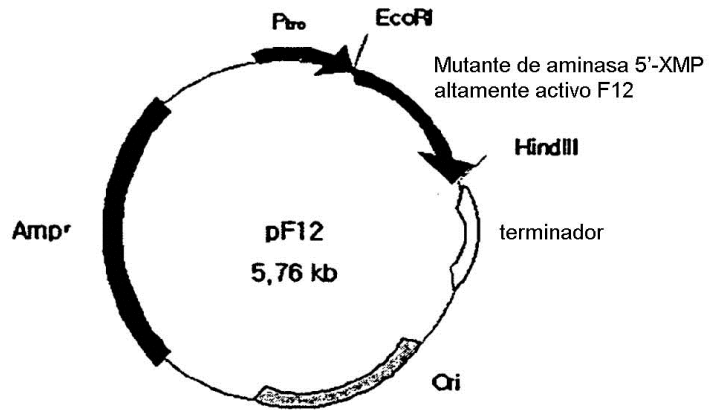
[Fig. 2]



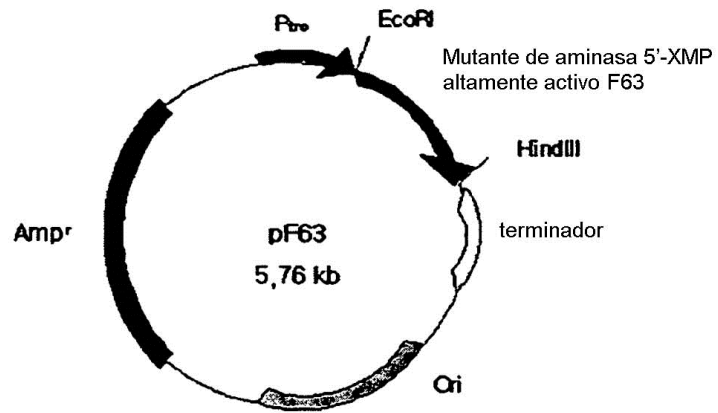
[FIG. 3]



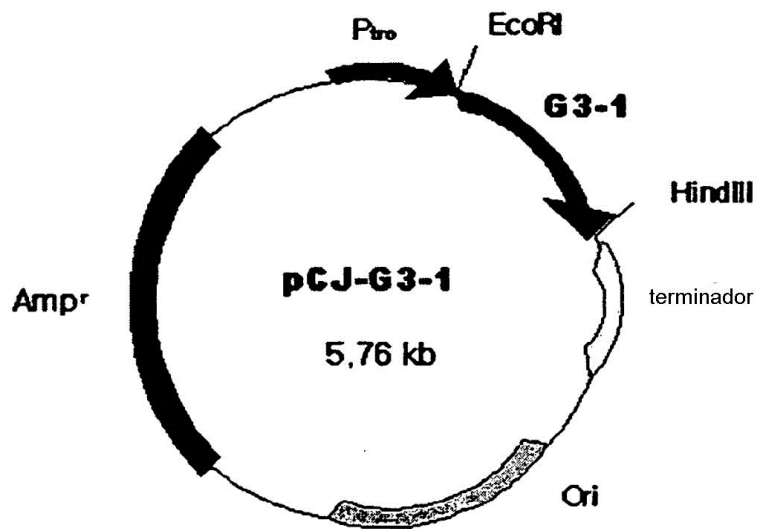
[FIG. 4]



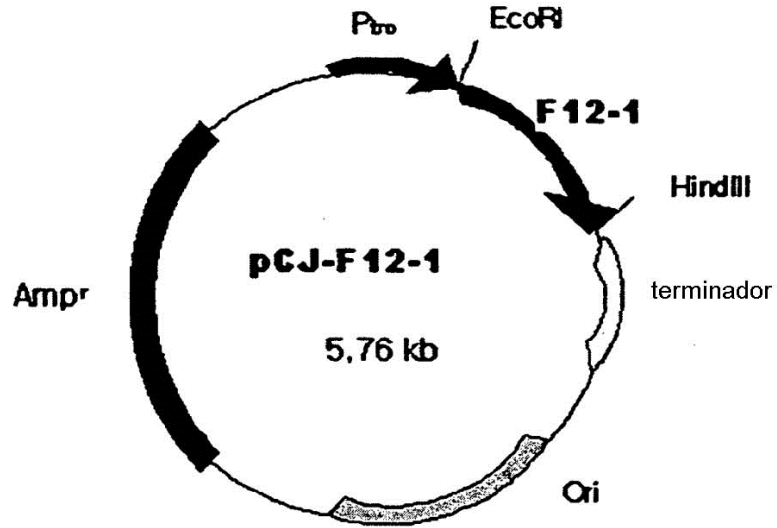
[FIG. 5]



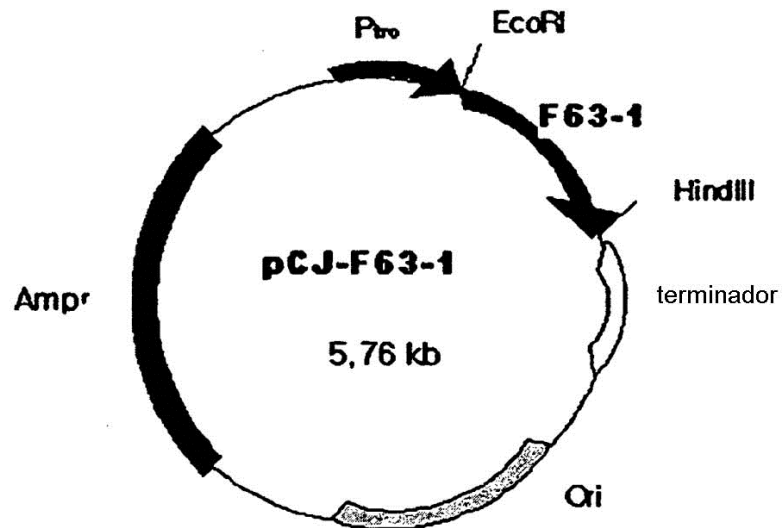
[FIG. 6]



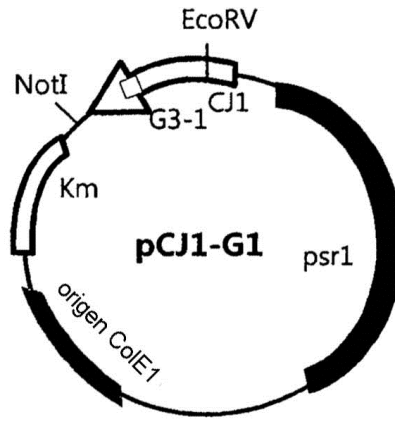
[FIG. 7]



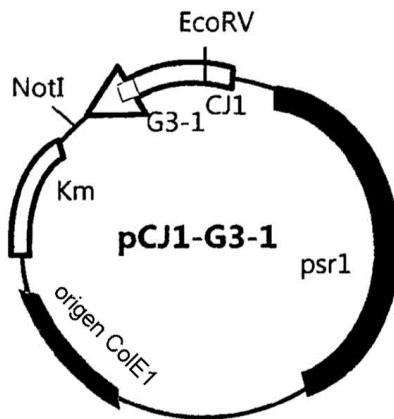
[FIG. 8]



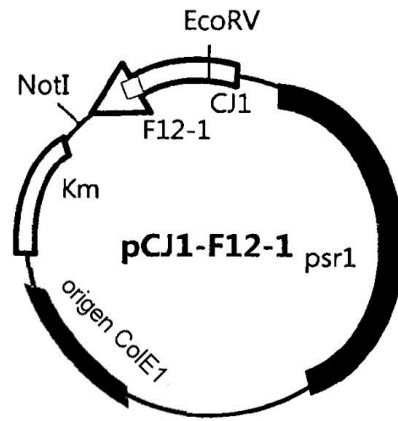
[Fig. 9]



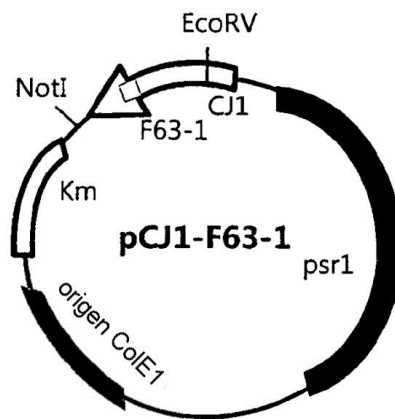
[Fig. 10]



[Fig. 11]

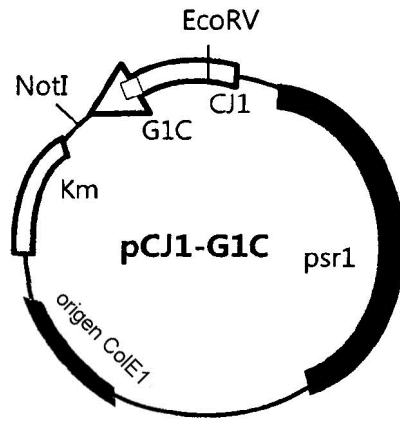


[Fig. 12]

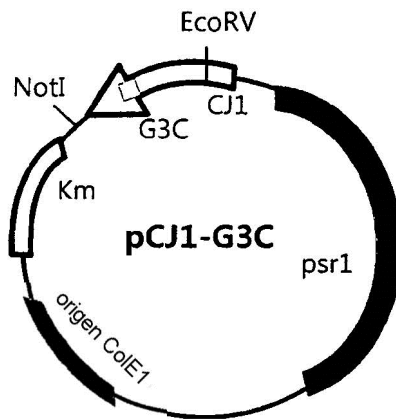




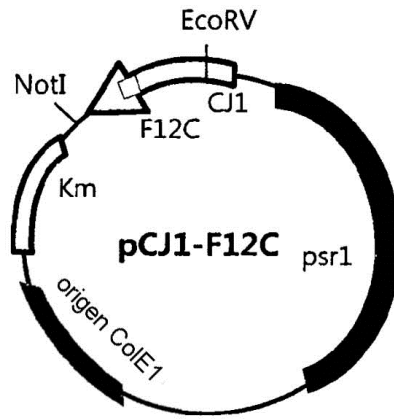
[Fig. 13]



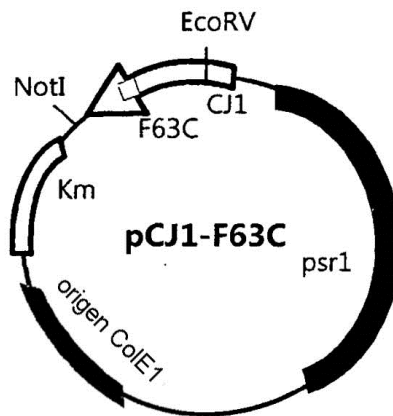
[Fig. 14]



[Fig. 15]

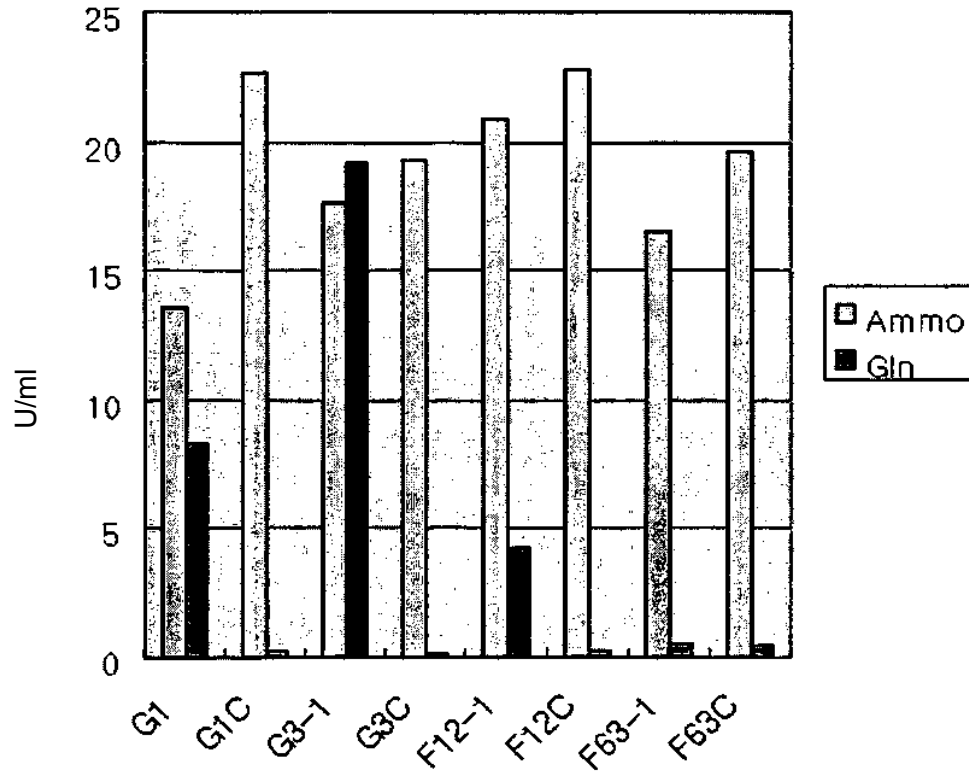


[Fig. 16]



[FIG. 17]

Actividad de mutantes GuaA



[FIG. 18]

Estabilidad de plásmido

