

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 865**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/80** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 14173437 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2851423**

54 Título: **Acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes**

30 Prioridad:

**28.12.2005 EP 05113024**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.05.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VAN DER LAAN, JAN METSKE;  
KERKMAN, RICHARD;  
BIJLEVELD, WILLEM y  
GIELESEN, BIANCA ELISABETH MARIA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 571 865 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

Acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes

5 La presente invención se refiere a acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes, a polinucleótidos que codifican dichas enzimas y a microorganismos transformados con dichos polinucleótidos, así como a métodos para producir la beta-lactama de tipo II mutante. La invención se refiere, además, a un procedimiento para la producción de un compuesto de beta-lactama desacilado de interés utilizando las acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes de la invención.

10 Los antibióticos beta-lactámicos constituyen el grupo más importante de compuestos antibióticos, con un largo historial de uso clínico. Entre este grupo, los más prominentes son las penicilinas y cefalosporinas. Las penicilinas son producidas de forma natural por diversos hongos filamentosos tales como *Penicillium* (p. ej., *P. chrysogenum*). Las cefalosporinas son producidas de forma natural por diversos microorganismos tales como *Acremonium* (p. ej., *A. chrysogenum*) y *Streptomyces* (p. ej., *Streptomyces clavuligerus*).

15 Como resultado de las técnicas de mejora de la cepa clásicas, los niveles de producción de los antibióticos de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* han aumentó notablemente a lo largo de las últimas décadas. Con el creciente conocimiento de las vías biosintéticas que conducen a penicilinas y cefalosporinas y el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, se han vuelto disponibles nuevas herramientas para la mejora de las cepas de producción.

20 La mayoría de las enzimas implicadas en la biosíntesis de beta-lactamas han sido identificadas y sus correspondientes genes han sido clonados tal como se puede encontrar en Ingolia y Queener, Med Res Rev (1989) 9:245-264 (ruta de biosíntesis y enzimas) y Aharonowitz, Cohen y Martin, Ann Rev Microbiol (1992) 46:461-495 (clonación de genes).

25 Las dos primeras etapas en la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* son la condensación de los tres aminoácidos ácido L-5-amino-5-carboxipentanoico (ácido L-alfalfa-aminoadípico) (A), L-cisteína (C) y L-valina (V) en el tripéptido LLD-ACV, seguido de ciclación de este tripéptido para formar isopenicilina N. Este compuesto contiene la típica estructura de beta-lactama. La tercera etapa implica la sustitución de la cadena lateral hidrófila del ácido L-5-amino-5-carboxipentanoico con una cadena lateral hidrofóbica por la acción de la enzima aciltransferasa (AT).

30 En el documento EP-A-0448180 se ha descrito que la reacción de intercambio enzimática mediada por AT tiene lugar dentro de una organela celular, el microcuerpo. La observación de que se pueden formar cantidades sustanciales de deacetoxicefalosporina C (DAOC) por transformantes no presagiados de *P. chrysogenum* expresan deacetoxicefalosporina C sintasa (EC 1.14.20.1 - DAOCS, se indica adicionalmente en esta memoria como expandasa) implica la presencia de cantidades significativas de penicilina N, el sustrato natural para expandasa, en *P. chrysogenum* (Alvi et al, J Antibiot (1995) 48:338-340). Sin embargo, las cadenas laterales de D-alfa-amino-adipilo de DAOC no se pueden separar fácilmente.

35 Las cefalosporinas son mucho más caras que las penicilinas. Una razón es que algunas cefalosporinas (p. ej., cefalexina) se preparan a partir de penicilinas mediante un cierto número de conversiones químicas. Otra razón es que, hasta ahora, sólo se pueden fermentar cefalosporinas con una cadena lateral de D-alfa-amino-adipilo. La cefalosporina C, de lejos el material de partida más importante a este respecto, es muy soluble en agua a cualquier pH, implicando así procesos de aislamiento largos y costosos utilizando tecnologías de columna engorrosas y caras. La cefalosporina C obtenida de esta manera tiene que ser convertida en cefalosporinas utilizadas terapéuticamente por un número de conversiones químicas y enzimáticas.

40 Los métodos actualmente favorecidos en la industria para preparar el compuesto intermedio ácido 7-amino-deacetoxicefaloporánico (7-ADCA) implican etapas químicas complejas que conducen a la expansión y derivatización de penicilina G. Una de las etapas químicas necesarias para producir 7-ADCA implica la expansión de la estructura de anillo de 5 miembros de la penicilina a una estructura de anillo de 6 miembros de la cefalosporina (véase, por ejemplo, el documento US 4.003.894). Este procesamiento químico complejo es tanto costoso como nocivo para el medio ambiente. Por consiguiente, hay un gran deseo de reemplazar dichos procesos químicos por reacciones enzimáticas tales como la catálisis enzimática, preferiblemente durante la fermentación. Una clave para la sustitución del proceso de expansión química mediante un proceso biológico es la enzima central en la vía biosintética de la cefalosporina, expandasa. Se encontró que la enzima expandasa de la bacteria *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) lleva a cabo, en algunos casos, expansiones del anillo de penicilina. Cuando se

introduce en *P. chrysogenum*, puede convertir la estructura del anillo de penicilina en la estructura del anillo de cefalosporina tal como se describe en Cantwell et al., Proc R Soc Lond B (1992) 248:283-289. Puesto que la enzima expandasa cataliza la expansión del anillo de tiazolidina de 5 miembros de la penicilina N al anillo de dihidrotiazina de 6 miembros de DAOC, esta enzima sería, por supuesto, un candidato lógico para reemplazar las etapas de expansión del anillo del proceso químico. Desafortunadamente, la enzima actúa sobre el compuesto intermedio de la penicilina N de la vía biosintética de la cefalosporina, pero no o de manera muy ineficiente sobre las penicilinas económicas fácilmente disponibles tales como las producidas por *P. chrysogenum*, tales como la penicilina V o la penicilina G. La penicilina N no está disponible comercialmente e incluso cuando se expande, su cadena lateral D-alfa-amino-adipilo no se puede separar fácilmente mediante acilasas de penicilina.

Se ha informado que la enzima expandasa es capaz de expandir penicilinas con cadenas laterales particulares en el derivado de 7-ADCA correspondiente. Esta característica de la expandasa ha sido explotada en la tecnología tal como se describe en los documentos WO93/05158, WO95/04148 y WO95/04149. En estas descripciones, el producto químico convencional en la conversión *in vitro* de la penicilina G a 7-ADCA ha sido reemplazado por la conversión *in vivo* de determinados derivados de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) en cepas de *Penicillium chrysogenum* recombinantes transformadas con un gen expandasa. Más particularmente, el documento WO93/05158 enseña el uso *in vivo* de la enzima expandasa en *P. chrysogenum*, en combinación con una cadena lateral de adipilo (a la que se alude en adelante como adipilo) como material de alimentación, que es un sustrato para la enzima aciltransferasa en *P. chrysogenum*. Esto conduce a la formación de adipil-6-APA, que se convierte por una enzima expandasa introducida en la cepa de *P. chrysogenum* para producir adipil-7-ADCA, que se excreta por las células de hongos en el medio circundante.

En una etapa subsiguiente, las cadenas laterales de los correspondientes derivados de 7-ADCA pueden ser escindidas, ya sea química o enzimáticamente, por una enzima acilasa, produciendo de este modo 7-ADCA y la cadena lateral correspondiente. Se han propuesto diversos tipos de microorganismos en la bibliografía como cepas productoras de acilasa, útiles para la desacilación de los derivados de beta-lactama obtenidos por fermentación. Ejemplos de tales microorganismos productores de acilasa son determinadas cepas de las especies *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* y *Arthrobacter viscosus*.

De acuerdo con la bibliografía se pueden prever varios tipos de acilasas, en función de su estructura molecular y su especificidad para el sustrato (Vandamme E. J. "Penicillin acylases and beta-lactamases" En: "Microbial Enzymes and Bioconversions" E. H. Rose (Comp.), Economic Microbiology 5 (1980) 467-552, Acad. Press, New York).

Las acilasas de tipo I son específicas para la penicilina V. Estas enzimas se componen de cuatro subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 35 kDa. Se ha informado de una secuencia completa de nucleótidos del gen clonado de *Bacillus sphaericus* (Ollson A. Appl. Environm. Microb. (1976), 203).

Las acilasas de tipo II comparten todas una estructura molecular común: estas enzimas son heterodímeros compuestos por una pequeña subunidad alfa (20-25 kDa) y una gran subunidad beta (60-65 kDa). Con respecto a la especificidad para el sustrato, las acilasas de tipo II se pueden dividir adicionalmente en dos grupos

Acilasas de tipo IIA son muy específicas para la penicilina G y, por lo tanto, se las conoce generalmente como penicilina acilasas. En general, no son tan específicas para el resto adyacente al átomo de nitrógeno del grupo amida (éste podría ser un grupo cefem, un grupo penem, un aminoácido, etc.), pero la especificidad para el sustrato reside en el resto acilo del sustrato. Este resto acilo debe ser muy hidrófobo y es preferiblemente bencilo o alquilo (corto). Ejemplos de sustratos que no son hidrolizados por acilasas de tipo IIA son aquellos con ácidos dicarboxílicos como resto acilo: succinilo, glutarilo, adipilo y amino adipilo, la cadena lateral de CefC. Ejemplos de acilasas de tipo IIA son las enzimas de *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Proteus rettgeri* y *Alcaligenes faecalis*.

Se ha informado que acilasas de tipo-IIB son capaces de hidrolizar cefalosporinas (incluyendo el derivado desacetoxi) con succinilo, glutarilo, adipilo y  $\alpha$ -ceto adipilo como un resto acilo e incluso CefC en un grado muy limitado. El grupo de acilasas de tipo-IIB de nuevo se puede dividir en dos grupos sobre la base de la homología de la secuencia de aminoácidos. Estos subgrupos se definirán aquí como el grupo SY77 y el grupo SE83 y se nombran detrás de la acilasa de *Pseudomonas* SY77 y *Pseudomonas* SE83-acil, respectivamente.

Matsuda et al (J. Bacteriol (1985), 163, 1222 han clonado y secuenciado el gen que codifica la SY77-acilasa y han demostrado que la enzima era activa con relación a glutaril-7ACA, pero mucho menos con relación a succinil-7ACA y adipil-7ACA. La estructura tridimensional para el precursor de SY77 es conocida (J. Biol. Chem. (2002), 277, 2823).

Posteriormente, Matsuda et al. (J. Bacteriol. (1987), 169, 5815 y J. Bacteriol. (1987), 169, 5821) clonaron y secuenciaron el gen que codifica la acilasa SE83-acil y demostraron que esta enzima era activa con relación a (en orden decreciente) glutaril-7ACA, adipil-7ACA, succinil-7ACA y CEFC (cefalosporina C). Todos los estudios relacionados con SE83 se centraron en la capacidad de la enzima de hidrolizar derivados de 7-ACA, en particular, de hidrolizar CEFC.

En el documento WO91/16435 se ha demostrado que la homología de aminoácidos entre SY77 y SE83-acil es muy baja: aproximadamente el 25% para las subunidades alfa y el 28% para las subunidades beta de las acilasas.

El documento WO9512680 describe otra acilasa del grupo SE83 de *Brevundimonas diminuta*, denominada N176, que es aproximadamente un 94% homóloga a SE83-acil y que fue sometida a ensayo por su actividad de CEFC-acilasa. Un tercer miembro del grupo SE83 es V22 de *Brevundimonas diminuta* V22. Las secuencias de aminoácidos de estas tres acilasas se describen por Aramori et al en Journal of Fermentation and Bioengineering 72, 232-243 (1991). La Tabla 0 muestra la matriz de identidad de secuencia de longitud completa de las secuencias de aminoácidos de las diversas acilasas de tipo IIB del grupo SE83.

Tabla 0.

Acilasa de tipo IIB	SE83-acil	N176	V22
SE83acil	100	94	93
N176	94	100	98
V22	93	98	100

Se han hecho varios intentos para aumentar la actividad de CEFC-acilasa de unas pocas acilasas existentes: el documento WO2005014821 describe mutantes de la SE83-acilasa y el documento EP-A-1553175 describe mutantes de la N176-acilasa, todo con el fin de mejorar la actividad de la CEFC-acilasa. Ninguna de las referencias citadas se centró en la mejora de la reacción de desacilación con otros compuestos de beta-lactama acilados de interés tales como adipil-7-ADCA. Por lo tanto, todavía hay una necesidad urgente de una acilasa con una actividad desacilante mejorada hacia adipil-7ADCA y que puede ser utilizada ventajosamente en un procedimiento para la producción de 7-ADCA a partir de adipil-7-ADCA, producido, por ejemplo, por fermentación de una cepa de *Penicillium* transformada.

Figura 1: Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las acilasas de beta-lactama de tipo II SE83-acil de *Pseudomonas* SE83 (SEQ ID No.1), N176 de *Brevundimonas diminuta* N-176 (SEQ ID No. 2) y V22 de *Brevundimonas diminuta* V22 (SEQ ID No. 3)

Figura 2: Conversión de adipil-7ADCA mediante acilasa inmovilizada a pH = 8,8 y 30°C (Figura 2a) y a pH = 9,5 y 40°C (Figura 2b). Acilasa inmovilizada de tipo salvaje ACYii de *Pseudomonas* SE83 (línea continua) y acilasa inmovilizada L161T mutante (línea discontinua). La tasa (ml de KOH/min en el eje Y) se representa gráficamente como una función de la conversión en porcentaje (% en el eje X).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un mutante de acilasa de beta-lactama de tipo II que es una variante de un polipéptido modelo con la actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II por el que la acilasa de beta-lactama mutante tiene una actividad de acilasa de beta-lactama in vitro al menos 1,5 veces mejorada hacia adipil-7-ADCA, en comparación con el polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama. La determinación de la actividad de acilasa de beta-lactama in vitro hacia adipil-7-ADCA se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos. Más preferiblemente, la actividad de acilasa de beta-lactama in vitro hacia adipil-7-ADCA de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se mejora al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 2,5 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 9 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 11 veces.

Con "acilasa de beta-lactama de tipo II alterada o mutante" en el contexto de la presente invención se quiere dar a entender cualquier enzima que tenga actividad de acilasa, que no haya sido obtenida de una fuente natural y para la cual la secuencia de aminoácidos difiere de las secuencias de aminoácidos completas de las enzimas acilasa de beta-lactama de tipo II naturales.

Realizaciones muy preferidas de la presente invención son mutantes del modelo acilasas de beta-lactama de tipo II seleccionados del grupo que consiste en la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3, y polipéptidos con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II que tienen una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 2 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 3 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% y que pueden portar una de las siguientes modificaciones: L161G, L161S o L161T.

La invención también proporciona una acilasa de beta-lactama de tipo II mutante que es una variante de un polipéptido modelo con la actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II, en donde la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante ha sido modificada, además de la posición 161, en al menos una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 270, 296, 442 y 589, o del grupo que consiste en las posiciones 10, 29, 274, 280, 314, 514, 645, 694, 706 y 726, o del grupo que consiste en 10, 29, 270, 274, 280, 296, 314, 442, 514, 589, 645, 694, 706 y 726 o del grupo que consiste en 10, 29, 270, 274, 280, 442, 514, 589, 645, 694 y 726 utilizando la numeración de la posición de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la acilasa SE83-acill de *Pseudomonas* (SEQ ID NO: 1).

Más preferiblemente, la presente invención proporciona una acilasa de beta-lactama de tipo II mutante que es una variante de un polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II, en donde la acilasa de beta-lactama mutante tiene una actividad de acilasa de beta-lactama in vitro al menos 1,5 veces mejorada hacia adipil-7-ADCA, en comparación con el polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 2,5 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 9 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 11 veces, con lo que la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante ha sido modificada, además de la posición 161, en al menos una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 270, 296, 442 y 589, o del grupo que consiste en las posiciones 10, 29, 274, 280, 314, 514, 645, 694, 706 y 726, o del grupo que consiste en 10, 29, 270, 274, 280, 296, 314, 442, 514, 589, 645, 694, 706 y 726 o del grupo que consiste en 10, 29, 270, 274, 280, 442, 514, 589, 645, 694 y 726 utilizando la numeración de la posición de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la acilasa SE83-acill de *Pseudomonas* (SEQ ID NO: 1).

La presente invención proporciona también una acilasa de beta-lactama de tipo II mutante que es una variante de un polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II, en donde el mutante de tipo II acilasa beta-lactama se ha modificado al menos en una combinación de posiciones 161 + 270 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 296 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 442 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 589 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 270 + 296 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 270 + 442 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 270 + 589, o al menos en una combinación de posiciones 161 + 296 + 589 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 296 + 442 o al menos en una combinación de posiciones 161 + 296 + 589, o al menos en una combinación de posiciones 161, 270, 296, 442 y 589, y en donde las acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes pueden tener modificaciones en otras posiciones de aminoácidos, además de esas posiciones y todas las combinaciones posibles de los mismos como se ha descrito antes utilizando la numeración de la posición de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la acilasa SE83-acyll de *Pseudomonas* (SEQ ID NO: 1).

El polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II tal como se utiliza en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II, que tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 (es decir, la acilasa SE83-acyll de *Pseudomonas* especie SE83) o que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 (es decir, la acilasa N176 de *Pseudomonas* especie N176) o que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 (es decir, la acilasa V22 de *Brevundimonas diminuta* V22) y polipéptidos con la actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II que tienen una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 2 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 3 de al menos 70%,

preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%. Más preferido como polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II tal como se utiliza en la presente invención es un polipéptido con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3. El más preferido como polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II es la acilasa SE83-acyll de Pseudomonas (SEQ ID NO: 1).

La presente invención proporciona preferiblemente mutantes de las acilasas de beta-lactama de tipo II modelo seleccionados del grupo que consiste en la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 y polipéptidos con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II que tienen una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 2 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 3 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75% , más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% y en el que los mutantes tienen modificaciones, además de una modificación en la posición 161, al menos en la posición 10 o al menos en la posición 29, al menos en la posición 161 o al menos en la posición 270 o al menos en la posición 274 o al menos en la posición 280 o al menos en la posición 296 o al menos en la posición 314 o al menos en la posición 442 o al menos en la posición 514 o al menos en la posición 589 o al menos en la posición 645 o al menos en la posición 694 o al menos en la posición 706 o al menos en la posición 726. En una realización, la invención proporciona acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes que tienen una sola modificación, ya sea en la posición 161 o en la posición 296 utilizando la numeración de la posición de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la acilasa SE83-acil de Pseudomonas (SEQ ID NO: 1 ).

Tabla 1

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

La modificación en una posición de aminoácido puede comprender una sustitución por otro aminoácido, seleccionado de entre el grupo de 20 L-aminoácidos que se producen en la naturaleza - véase la Tabla 1. Alternativamente, la modificación en una posición de aminoácido puede comprender una delección de aminoácido en dicha posición. Además, la modificación en una posición de aminoácido puede comprender una sustitución de uno o más aminoácidos en el lado C-terminal o N-terminal de dicho aminoácido.

La acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la invención, preferiblemente los mutantes de las acilasas de beta-lactama de tipo II modelo seleccionados del grupo que consiste en la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos

de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 portan una sustitución de la leucina en la posición 161 por un aminoácido más pequeño y más polar tal como treonina, serina, glicina y cisteína o uno cargado positivamente en torno a pH=9 tal como arginina y lisina, preferiblemente por serina o treonina o glicina, lo más preferiblemente por treonina, y pueden portar una o más de las siguientes modificaciones:

- 5       • Sustitución del glutamato (SEQ ID NO: 1) o alanina (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3) en la posición 10 por un residuo de aminoácido cargado positivamente tal como lisina o arginina o un pequeño residuo de aminoácido, con preferencia conformacional para la formación de la hélice  $\alpha$  tal como alanina, preferiblemente por lisina.
- 10       • Sustitución de la serina en la posición 29 por un aminoácido con una cadena lateral (tipo) aromática tal como fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina, o con una cadena lateral más grande polar, sin carga o cargada positivamente, tal como asparagina, glutamina, arginina y lisina, preferiblemente por asparagina o fenilalanina.
- 15       • Sustitución de la histidina en la posición 274 por un residuo de aminoácido que contiene al menos un átomo de carbono, oxígeno o azufre en la posición gamma de la cadena lateral y que es más pequeño en tamaño en comparación con histidina tal como leucina, isoleucina, cisteína, treonina, serina, asparagina, valina y prolina, preferiblemente por leucina, isoleucina, cisteína o treonina.
- 20       • Sustitución de la arginina en la posición 280 por un residuo de aminoácido que sustituye la carga positiva por una carga negativa tal como ácido aspártico y ácido glutámico o por una cadena lateral polar no ramificada y sin carga tal como glutamina, asparagina y serina, preferiblemente glutamina y asparagina, lo más preferiblemente glutamina.
- 25       • Sustitución de la histidina en la posición 296 por un aminoácido cargado o polar o un residuo de aminoácido que es capaz de reemplazar el enlace hidrógeno existente en la acilasa modelo por los átomos N-delta o N-épsilon del residuo de histidina tal como por asparagina y glutamina, de preferencia por una glutamina.
- 30       • Sustitución de la isoleucina en la posición 314 por un residuo de aminoácido más pequeño con ramificación  $\beta$  tales como valina o por una cadena lateral polar de tamaño medio tal como glutamina, asparagina, serina y treonina, preferiblemente por valina o glutamina.
- 35       • Sustitución del ácido glutámico en la posición 442 por un residuo de aminoácido con ninguna o con una pequeña cadena lateral hidrofóbica tal como glicina, alanina, leucina, valina e isoleucina, preferiblemente glicina.
- 40       • Sustitución de la prolina en la posición 514 por un residuo de aminoácido con una cadena lateral más polar y/o más flexible que es capaz de contribuir en la unión adicional de hidrógeno tal como glutamina, asparagina, treonina, serina, cisteína, ácido aspártico y ácido glutámico, preferiblemente glutamina.
- 45       • Sustitución de la arginina en la posición 589 por un residuo de aminoácido que puede mantener una carga positiva en un determinado entorno tal como histidina y lisina, o por cadenas laterales aromáticas capaces de formar enlaces hidrógeno tales como tirosina y triptófano, o por residuos de aminoácidos que son capaces de reemplazar el enlace hidrógeno existente en la acilasa modelo por los átomos N-delta o N-épsilon del residuo de histidina tal como por asparagina y glutamina, de preferencia por histidina.
- 50       • Sustitución de la alanina en la posición 645 por un residuo de aminoácido pequeño, con una preferencia incrementada por la formación de la hebra  $\beta$  tal como treonina, valina, serina, cisteína y leucina, preferiblemente por treonina.
- 55       • Sustitución de la asparagina en la posición 694 por un residuo de aminoácido con una cadena lateral más pequeño que asparagina tal como alanina, treonina, serina, cisteína, valina y glicina, preferiblemente por una treonina.
- 60       • Sustitución de la tirosina en la posición 706 por un residuo de aminoácido sin o con una cadena lateral más pequeño que leucina tal como glicina, alanina, valina, serina, cisteína, treonina y prolina, preferiblemente una glicina.
- Sustitución de la valina en 726 por un residuo de aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica más grande tal como isoleucina, leucina y metionina, preferiblemente una isoleucina.

Realizaciones muy preferidas de la presente invención son mutantes de las acilasas de beta-lactama de tipo II modelo seleccionadas del grupo que consiste en la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y la acilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y polipéptidos con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II que tienen una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 2 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más

preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, o con SEQ ID NO: 3 de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% y que portan una modificación en las siguientes combinaciones de 2 posiciones: [161 + 10], [161 + 29] o [161 + 694] o [161 + 726] o [161 + 274] o [161 + 706] o [161 + 442] o [161 + 589] o [161 + 314] o tienen modificaciones en las siguientes combinaciones de 3 posiciones: [161 + 29 + 274], [161 + 29 + 706], [161 + 29 + 514], [161 + 274 + 589] o [161 + 274 + 706], o en las siguientes combinaciones de 4 posiciones: [161 + 29 + 274 + 726], [161 + 274 + 280 + 314], o las siguientes combinaciones en 5 posiciones: [161 + 29 + 274 + 314 + 694], [161 + 274 + 280 + 514 + 726] o las siguientes combinaciones de 6 posiciones: [161 + 29 + 280 + 314 + 645 + 726].

La presente invención proporciona preferiblemente mutantes de la acilasa SE83-acil de *Pseudomonas* (SEQ ID NO: 1) que tienen modificaciones al menos en una combinación de posiciones L161 + M270 o al menos en una combinación de posiciones L161 + H296 o al menos en una combinación de posiciones L161 + E442 o al menos en una combinación de posiciones L161 + R589 o al menos en una combinación de posiciones L161 + M270 + H296 o al menos en una combinación de posiciones L161 + M270 + E442 o al menos en una combinación de posiciones L161 + H296 + R589 o al menos en una combinación de posiciones L161 + H296 + E442 o al menos en una combinación de posiciones L161 + H296 + R589, y en donde las acilasas de beta-lactama de tipo II mutantes pueden tener modificaciones en otras posiciones de aminoácidos, además de esas posiciones y todas las combinaciones posibles de los mismos como se ha descrito antes. Formas de realización muy preferidas de la presente invención son los mutantes SE83-AcylI de *Pseudomonas* resumidos en las Tablas 2-5 de los Ejemplos.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la presente invención. La invención proporciona también polinucleótidos que codifican la subunidad alfa de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante, así como polinucleótidos que codifican la subunidad beta de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante. El documento WO2005/014821 describe en las páginas 8 y 9 que los genes que codifican las acilasas del grupo SE83 codifican un polipéptido compuesto de una subunidad  $\alpha$ , un péptido espaciador y una subunidad  $\beta$ , en ese orden. La acilasa derivada de SE83 de *Pseudomonas sp.* es generada en forma de un polipéptido de cadena sencilla inactivo que tiene un tamaño de aproximadamente 84 kDa después de sufrir transcripción y traducción en una célula huésped. Después de ello, se producen dos auto-digestiones entre los aminoácidos en las posiciones 230 y 231, y en las posiciones 239 y 240 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, lo que resulta en la separación del péptido espaciador que consiste en 9 aminoácidos, y en la separación en una subunidad  $\alpha$  de 25 kDa y una subunidad  $\beta$  de 58 kDa. Una subunidad  $\alpha$  está unida a una subunidad  $\beta$  a través de interacciones hidrofóbicas, para formar un heterodímero de aproximadamente 83 kDa que tiene actividad de acilasa. Como se conoce en general se necesita el primer codón (ATG) que codifica la metionina N-terminal para el inicio de la traducción durante la síntesis de proteínas en un procarionte. La metionina se retira después de la traducción.

El polinucleótido que codifica la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante o la subunidad alfa o la subunidad beta de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos correcta de acuerdo con la invención. Alternativamente, el polinucleótido de la invención puede comprender una secuencia codificadora en la que el uso de codones para los diversos aminoácidos se desvía del uso de codones en *Pseudomonas*. Por ejemplo, el uso de codones se puede adaptar al uso de codones de una célula huésped particular, o que será o ha sido transformada con el fragmento de ADN que codifica la acilasa de beta-lactama de tipo II alterada.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de expresión o una casete de expresión que comprende el polinucleótido de la invención tal como se define anteriormente en esta memoria.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula huésped transformada, transformada con el polinucleótido de la invención o el vector de expresión o la casete de expresión de la invención. La célula huésped transformada se puede utilizar para la producción de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la invención.

Células huésped para la producción de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la invención son preferiblemente células huésped que son conocidas en la técnica por su producción eficaz de proteínas o de enzimas, ya sea de forma extracelular o intracelular, por ejemplo microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias. Ejemplos de células huésped preferidas comprenden, pero no se limitan a, los siguientes géneros: *Aspergillus* (p. ej., *A. niger*, *A. oryzae*), *Penicillium* (p. ej., *P. emersonii*, *P. chrysogenum*), *Saccharomyces* (p. ej., *S. cerevisiae*), *Kluyveromyces* (p. ej., *K. lactis*), *Bacillus* (p. ej., *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*), *Escherichia* (*E. coli*), *Streptomyces* (p. ej., *S. clavuligerus*), *Pseudomonas*.



En un quinto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la invención, que comprende cultivar la célula huésped transformada de acuerdo con la invención en condiciones que conducen a la producción de la expandasa mutante y, opcionalmente, recuperar la expandasa mutante.

5 En un sexto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un compuesto de beta-lactama desacilado de interés, que comprende la etapa de desacilar un precursor acilado del compuesto de beta-lactama de interés utilizando la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la invención. Compuestos de beta-lactama desacilados de interés pueden ser derivados de penicilinas o cefalosporinas que se producen de forma natural tales como 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, 7-ADAC, ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico (p. ej., documento WO2004/106347) y otros. Preferiblemente, el compuesto de beta-lactama desacilado de interés es 7-ADCA o 7-ACA, el más preferido es 7-ADCA. Precursores acilados del compuesto de beta-lactama de interés pueden tener un acilo que pertenece al grupo consistente en ácidos dicarboxílicos. Grupos acilo preferidos son succinilo, glutarilo, adipilo, alfa-cetoadipilo y amino adipilo. Más preferidos son adipilo y amino adipilo, muy preferido es adipilo. Precursores acilados preferidos del compuesto de beta-lactama de interés son adipil-7-ADCA, adipil-7-ACA, amino adipil-7-ADCA y amino adipil-7-ACA, este último conocido como CEFC; el más preferido es adipil-7-ADCA.

El procedimiento de la invención para la producción de un compuesto de beta-lactama desacilado de interés se puede llevar a cabo en un modo discontinuo, con lo que la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se utiliza en un estado disuelto en una disolución que comprende el precursor acilado del compuesto de beta-lactama de interés.

20 Más preferiblemente, la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se utiliza como una forma inmovilizada. La ventaja de ello es que la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante puede ser recuperada después de completarse la reacción de desacilación y puede ser reutilizada para reacciones de desacilación adicionales. De esta manera, el costo en el uso de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se puede reducir significativamente, aumentando con ello el atractivo económico del proceso de desacilación. Condiciones para la reacción de desacilación, así como la inmovilización de la enzima son conocidos en la técnica anterior (p. ej., Kallenberg, A.I. *et al.* Adv. Synth. Catal. (2005), 347, 905-926).

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de la invención en un procedimiento para la producción de un compuesto de beta-lactama desacilado de interés, procedimiento que comprende la etapa de desacilar un precursor acilado del compuesto de beta-lactama de interés. Compuestos de beta-lactama desacilados de interés pueden ser derivados de penicilinas o cefalosporinas que se producen de forma natural tales como 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, 7-ADAC, ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico y otros. Preferiblemente, el compuesto de beta-lactama desacilado de interés es 7-ADCA o 7-ACA, el más preferido es 7-ADCA. Precursores acilados del compuesto de beta-lactama de interés pueden tener un acilo que pertenece al grupo consistente en ácidos dicarboxílicos. Grupos acilo preferidos son succinilo, glutarilo, adipilo, alfa-cetoadipilo y amino adipilo. Más preferidos son adipilo y amino adipilo, muy preferido es adipilo. Los precursores acilados más preferidos del compuesto de beta-lactama de interés son adipil-7-ADCA, adipil-7-ACA, ácido adipil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, alfa-cetoadipil-7-ADCA, alfa-cetoadipil-7-ACA, amino adipil-7-ADCA, amino adipil-7-ACA, este último conocido como CEFC. El procedimiento de la invención para la producción de un compuesto de beta-lactama desacilado de interés puede llevarse a cabo en un modo discontinuo, con lo que la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se utiliza en un estado disuelto en una disolución que comprende el precursor acilado del compuesto de beta-lactama de interés. Más preferiblemente, la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se utiliza en una forma inmovilizada.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Preparación de acilasa***

45 Plásmidos con el gen wt o genes mutantes se transformaron en células Top 10 de E. coli (Invitrogen). Las células se inocularon en matraces de 100 ml utilizando 20 ml de medio 2xTY que contenía 50 µg/ml de zeocina a 37°C y 280 rpm. Después de 24 horas, matraces con 100 ml de medio 2xTY, 50 µg/ml de zeocina y arabinosa al 0,05% se inocularon con 50 µl del cultivo 1:1000 y se cultivaron a 25°C y 280 rpm. Los cultivos se centrifugaron y se congelaron a -20°C. Con el fin de preparar un extracto libre de células, los sedimentos se resuspendieron en tampón de extracción (Tris/HCl 50 mM, 0,1 mg/ml de Dnasa1, 2 mg/ml de lisozima, DTT (ditiotreitól) 10 mM, MgSO4 5 mM) y se incubaron. Después de 30 minutos, el extracto se centrifugó y el sobrenadante que contiene la actividad de acilasa se utilizó para las mediciones de actividad.

- El contenido de acilasa se determinó utilizando electroforesis en gel de SDS-PAGE y cromatografía de exclusión de tamaño HPLC analítica realizada en una columna TSK 3000SWxl con tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 como eluyente. Condiciones cromatográficas aplicadas: caudal 1,0 ml/min y detección a 280 nm. Mediante la comparación de las zonas observadas de los picos de acilasa se puede comparar el contenido de proteína de diferentes muestras. El contenido de proteína acilasa se calcula a partir de la DO280 utilizando un coeficiente de extinción molar de 154350 ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ). En el caso de picos adicionales en el cromatograma de HPLC, el valor E280 de la muestra se corrige para la contribución de los picos adicionales.

### **Purificación**

- Sedimentos celulares de cultivos de 100 ml se resuspendieron con 1 ml de Tris 20 mM pH 8. Después de 9x10 segundos de tratamiento con ultrasonidos (Soniprep 150 I-BU03) con una amplitud de 10  $\mu$  en hielo (pausas de 15 segundos) la suspensión de células se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y 4°C en tubos de microcentrífuga. Después de llevar el sobrenadante a un pH de 5,3-5,4 con HCl 0,1M, se centrifugó para separar el precipitado. Posteriormente, el sobrenadante se tituló de nuevo a pH = 8 con NaOH. Aproximadamente 100-400  $\mu$ l se aplicaron a una columna MonoQ de 1 ml, que se equilibró con Tris 20 mM pH 8 que contiene NaCl al 10%. Tampón A (Tris 20 mM pH 8) y tampón B (Tris 20 mM pH 8 + NaCl 1 M) se mezclaron durante la elución como sigue: minutos 0-1 10% de B/90% de A; 1-5 20% de B/80% de A; 5-9 40% de B/60% de A; 9-12 60% de B/40% de A; 12-15 100% de B. Las fracciones pico que contenían actividad de acilasa se recogieron y se aplicaron a una columna de filtración en gel, TSKGel 3000SWxl, que se equilibró con tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7. Las fracciones de los picos se recogieron y almacenaron para su uso posterior.

### **Reactivos**

- Adipil-7ADCA se puede preparar a partir de ácido adípico y 7-ADCA mediante síntesis enzimática tal como se describe en el documento WO9848037. Además, adipil-7ADCA se puede preparar mediante síntesis química tal como se describe por Shibuya et al. en Agric. Biol. Chem., 1981, 45(7), 1561-1567, partiendo de anhídrido adípico en lugar de anhídrido glutárico.
- Una disolución madre al 8% (p/v) de sustrato de adipil-7ADCA se preparó en el tampón adecuado y se ajustó al pH deseado con NaOH 4 N.
- El reactivo de color 4-(dimetilamino)-benzaldehído (p-DMBA) se preparó recientemente mediante disolución de 200 mg en 100 ml de ácido cítrico (315,5 g de ácido cítrico monohidrato disuelto en 1 litro de etanol).
- Las mediciones de actividad en el intervalo de pH = 8,0 a pH = 10,0 se llevaron a cabo en tampón CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etano-sulfónico) 0,2 M, ajustado al pH deseado con HCl 4 N o NaOH 4 N según sea necesario.

### **Medición de la actividad de acilasa**

- 180  $\mu$ l del tampón apropiado se mezclaron con 200  $\mu$ l de la disolución madre de sustrato en el tampón correspondiente y 20  $\mu$ l de disolución de enzima y se incubaron durante 20 minutos a la temperatura deseada, habitualmente la temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. La adición de 600  $\mu$ l de reactivo de color detuvo la reacción. Después de 10 minutos a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 415 nm. Las mediciones se realizaron añadiendo disolución de color al ensayo antes de añadir la enzima. La actividad de acilasa se calcula como el incremento de la densidad óptica (DO) por minuto ( $\Delta DO/min$ ). Para el cálculo de las actividades absolutas se utilizó una línea de calibración de 7-ADCA en el intervalo de 0,1 a 1 g de 7-ADCA por litro.

### **Determinaciones de $K_M$ y curvas de pH**

- Se llevaron a cabo determinaciones de  $K_M$  utilizando el ensayo como se ha descrito. Sin embargo, la concentración adipil-7-ADCA se varió de 0,5 a 4% (p/v) de adipil-7ADCA.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1**

#### **Actividad de acilasa de mutantes SE83 ACYii**

La actividad de acilasa de los mutantes con adipil-7-ADCA como sustrato se determinó a pH = 8,5 y pH = 9,5. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

5 Tabla 2: Actividades relativas de acilasas de tipo salvaje y mutantes en adipil-7ADCA que ajustan la actividad de tipo salvaje a pH = 8,5 a 1. Entre paréntesis, las actividades relativas a la actividad de tipo salvaje a pH = 9,5. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las velocidades iniciales se midieron en presencia de adipil-7ADCA al 4% (p/v).

Enzima	Código	Actividad de acilasa		<u>Actividad a pH = 9,5</u> Actividad a pH = 8,5
		pH=8,5	pH=9,5	
Tipo salvaje	SE83 ACY-ii	1,00	0,61 (1,00)	0,61 (1,00)
Mutante	L161T	1,95	1,38 (2,26)	0,71 (1,16)
	H296Q	1,35	1,11 (1,82)	0,83 (1,36)
	L161S+E442G	1,68	1,22 (2,00)	0,73 (1,20)
	L161S+H589R	1,60	1,05 (1,72)	0,66 (1,08)

10 A pH = 8,5, así como a pH = 9,5 la actividad de los mutantes es significativamente mayor en comparación con la acilasa de tipo salvaje. Además, al comparar la actividad a pH = 9,5 con la actividad a pH = 8,5 resulta evidente que la actividad de la acilasa mutante a pH 9,5 es relativamente mayor en comparación con la de tipo salvaje. El perfil de actividad del pH de los mutantes se ha desplazado a un pH más alto, lo que hace a estos mutantes, en particular, adecuados para su uso a un pH elevado. Esto es de particular importancia, debido a que el rendimiento de la conversión se incrementará a pH más alto debido al desplazamiento del equilibrio termodinámico más hacia la finalización de la reacción de hidrólisis.

15 Dado que durante el proceso de conversión de adipil-7ADCA en 7-ADCA y ácido adípico la concentración de este último se incrementará, la inhibición del producto podría reducir las mejoras de los mutantes medidos en condiciones de velocidad inicial. Por lo tanto, se midió la actividad de las acilasas de tipo salvaje y mutantes en presencia de ácido adípico al 1,5 (p/v). La Tabla 3 muestra que en estas condiciones la actividad de los mutantes es significativamente mayor en comparación con la acilasa de tipo salvaje a pH = 8,5, así como a pH = 9,5. El perfil de actividad del pH para estos mutantes no se ha desplazado a un pH más alto.

20 La actividad de acilasa de tipo salvaje y acilasas mutantes utilizando adipil-7-ADCA como sustrato se determinó a pH = 8,6, pH = 9,1 y pH = 9,5, en presencia de ácido adípico al 1,5% (p/v). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

25 La Tabla 4 muestra que a pH = 8,6, pH = 9,1, así como a pH = 9,5 la actividad de los mutantes es significativamente mayor en comparación con la acilasa de tipo salvaje. Al comparar la mejora de la actividad a pH = 9,1 con la mejora de la actividad a pH = 8,6 (columnas con relación de actividades) resulta evidente que la actividad de las acilasas mutantes a pH 9,1 está relativamente más mejorada en comparación con el tipo salvaje. El perfil de actividad del pH de los mutantes se ha desplazado a un pH más alto, haciendo a estos mutantes, en particular, adecuados para su uso a un pH elevado. Al comparar el pH = 9,5 con el pH = 8,6, la actividad de la mayoría de las acilasas mutantes está aún más mejorada a pH = 9,5 que a pH = 8,5 en comparación con el tipo salvaje.

30 Tabla 3: Actividades relativas de acilasas de tipo salvaje y mutantes sobre adipil-7ADCA que ajustan la actividad de tipo salvaje a pH = 8,5 a 1. Entre paréntesis, las actividades relativas a la actividad de tipo salvaje a pH = 9,5. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente. La concentración inicial del sustrato era adipil-7ADCA al 4% (p/v). La actividad inicial se midió en presencia de ácido adípico al 1,5% (p/v).

Enzima	Código	Actividad de acilasa		<u>Actividad a pH = 9,5</u> Actividad a pH = 8,5
		pH=8,5	pH=9,5	
Tipo salvaje	SE83 ACY-ii	1,00	0,80 (1,00)	0,80 (1,00)
Mutante	L161G	2,53	1,80 (2,25)	0,71 (0,89)
	L161G+ E10K	2,13	1,47 (1,83)	0,69 (0,86)

Tabla 4: Actividades relativas de acilasas de tipo salvaje y mutantes sobre adipil-7ADCA que ajustan la actividad de tipo salvaje a pH = 8,6 a 1. Entre paréntesis, las actividades relativas a la actividad de tipo salvaje a pH = 9,1 y pH = 9,5, respectivamente. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente. La concentración inicial del sustrato fue de adipil-7ADCA al 2% (p/v). La actividad inicial se midió en presencia de ácido adípico al 1,5% (p/v).

Enzima / Mutante	Actividad Relativa a pH			Relación de actividades a	
	8,6	9,1	9,5	pH=9,1 pH= 8,6	pH=9,5 pH= 8,6
SE83 ACY-ii de tipo salvaje	1,00	0,76 (1,00)	0,94 (1,00)	0,76 (1,00)	0,94 (1,00)
L161S	2,23	2,24 (2,94)	2,02 (2,13)	1,01 (1,32)	0,90 (0,96)
L161T	2,08	2,57 (3,36)	1,89 (2,00)	1,23 (1,62)	0,91 (0,96)
L161T+S29N	2,28	2,82 (3,69)	2,61 (2,76)	1,23 (1,62)	1,14 (1,21)
L161T+H274L	3,58	5,59 (7,32)	6,27 (6,63)	1,56 (2,04)	1,75 (1,85)
L161T+S29N+H274L	4,46	6,63 (8,68)	7,29 (7,72)	1,49 (1,94)	1,63 (1,73)
L161T+I231 °314V	2,93	3,54 (4,63)	3,39 (3,58)	1,21 (1,58)	1,16 (1,22)
L161T+N694T	2,39	1,91 (2,49)	1,48 (1,57)	0,80 (1,04)	0,62 (0,65)
L161T+V726I	2,55	4,06 (5,32)	4,25 (4,50)	1,59 (2,09)	1,67 (1,76)
L161T+S29N	2,28	2,82 (3,69)	2,61 (2,76)	1,23 (1,62)	1,14 (1,21)
L161T+Y706G	4,51	4,05 (5,30)	3,65 (3,86)	0,90 (1,17)	0,81 (0,86)
L161T+S29N+Y706G	10,20	9,57 (12,53)	8,33 (8,82)	0,94 (1,23)	0,82 (0,86)
L161T+S29N+P514Q	3,08	3,16 (4,13)	2,98 (3,15)	1,03 (1,34)	0,97 (1,02)
L161T+S29N+H274L+ I314Q+N694T	8,92	9,39 (12,29)	9,69 (10,25)	1,05 (1,38)	1,09 (1,15)
L161T+S29N+R280Q+ I314V+A645T+V726I	5,35	7,26 (9,51)	7,20 (7,62)	1,36 (1,78)	1,34 (1,42)
L161T+S29F+H274L+ V726I	4,30	7,23 (9,46)	7,46 (7,89)	1,68 (2,20)	1,73 (1,84)
L161T+H274L+R280Q+ I314V	6,06	9,05 (11,85)	9,24 (9,78)	1,49 (1,96)	1,53 (1,61)
L161T+H274L+R589H	3,00	3,72 (4,87)	4,53 (4,79)	1,24 (1,62)	1,51 (1,60)
L161T+H274C+Y706G	7,50	7,24 (9,47)	7,60 (8,04)	0,97 (1,26)	1,01 (1,07)
L161S+H274T+R280Q + P514Q+V726I	4,09	4,19 (5,48)	4,82 (5,10)	1,02 (1,34)	1,18 (1,25)

5

## Ejemplo 2

### Afinidad por el sustrato indicada por la medición $K_M$ de mutantes SE83 ACYii

La Tabla 5 muestra los valores  $K_M$  medidos para un cierto número de mutantes con relación al tipo salvaje. La constante de Michaelis  $K_M$  representa la concentración de sustrato a la que la enzima funciona al 50% de su velocidad máxima. A concentraciones de sustrato por debajo de la  $K_M$ , la enzima se vuelve más lenta, a concentraciones de sustrato por encima de la  $K_M$  la enzima opera más rápido hasta que a una alta concentración de sustrato la enzima se vuelve totalmente saturada y opera a la velocidad máxima. Al final de una conversión enzimática en la que el sustrato se agota, una baja  $K_M$  es crucial con el fin de mantener la actividad sustancial. En el caso de que el valor relativo de  $K_M$  para un mutante sea  $<1,00$ , esto significa que a concentraciones de sustrato inferiores, p. ej., al final de la conversión, el mutante tiene una ventaja con respecto al tipo salvaje en el mantenimiento de una mayor actividad sustancial.

Tabla 5: Afinidades relativas de sustratos representadas como valores de  $K_M$  relativos. Las determinaciones de  $K_M$  se realizaron utilizando el ensayo tal como se describe anteriormente. La concentración de adipil-7ADCA se varió de 0,5 a 4% de adipil-7ADCA.

Enzima / Mutante	K <sub>M</sub> relativa a	
	pH = 8,6	pH = 9,5
SE83 ACYii Wt	1,00	1,00
L161T	0,43	1,33
L161S	0,40	0,92
L161T+N694T	0,64	1,37
L161T+I314V	0,39	0,87
L161T+I314V	0,43	0,89
S29N+L161T	0,51	1,19
S29N+L161T+P514Q	0,57	1,31
L161T+V726I	0,24	0,62
L161T+V726I	0,21	0,64
L161T+H274L	0,18	0,48
L161T+Y706G	0,40	1,10

### **Ejemplo 3**

#### **Actividad de acilasa de mutantes de SE83 ACYii inmovilizados**

- 5 La inmovilización se llevó a cabo según se describe en el documento WO97/04086 utilizando gelatina y quitosano como agentes y dialdehído glutárico gelificante como agente de reticulación. El rendimiento de la acilasa de tipo salvaje inmovilizada y acilasas mutantes se midió realizando una hidrólisis completa de adipil-7ADCA en un reactor de 100 ml controlado en temperatura y pH. Los experimentos se realizaron a adipil-7-ADCA al 3,2%. La enzima inmovilizada se dosificó de una forma tal que se podía obtener una conversión de al menos 90% dentro de los 120 minutos bajo las condiciones deseadas. Las conversiones se llevaron a cabo a pH = 8,8 y 30°C y a pH = 9,5 a 40°C. Se utilizó la misma cantidad (en peso) de acilasa de tipo salvaje y mutante para las conversiones. Durante la reacción, el pH se mantuvo constante mediante la adición de una disolución de KOH 1 M. La actividad de la acilasa inmovilizada se expresa como ml de KOH por min. En las Figuras 2a y 2b se muestra la tasa, expresada como ml de KOH por min, como una función de la conversión.
- 10
- 15 La media de 6 operaciones se tomó a pH = 8,8 y 30°C. No se incluyeron los datos de la primera conversión del 30%, debido a que el sistema no estaba completamente estabilizado, dando lugar a una gran dispersión de los datos. A pH = 9,5 y 40°C se tomó la media de dos operaciones. Por lo tanto, la variación es mayor. Sin embargo, la pendiente calculada proporciona una buena indicación de la actividad. Las Figuras 2a y 2b muestran que la actividad de la acilasa mutante es significativamente más alta durante toda la conversión.
- 20 La estabilidad de las acilasas inmovilizadas se determinó midiendo 20 conversiones subsiguientes de 180 minutos con el mismo lote de acilasa inmovilizada. Se midió la tasa de entre 30 y 50% de conversión de cada una de las incubaciones. La actividad residual de una acilasa inmovilizada se define aquí como la actividad de la 20ª incubación en comparación con la tasa de la primera incubación.
- 25 La Tabla 6 resume los resultados. Se observó que, en particular, en las condiciones que desplazan el equilibrio termodinámico de la reacción de hidrólisis a una conversión más completa (alta temperatura y alto pH) la estabilidad de la acilasa mutada está significativamente mejorada en comparación con el tipo salvaje.

Como consecuencia de esta actividad hidrolítica superior y de una mayor estabilidad de la acilasa mutada, la productividad por gramo de la enzima acilasa mutada se aumentó considerablemente.

Tabla 6: Actividad residual después de 20 conversiones en las condiciones indicadas.

ES 2 571 865 T3

Condición de la Reacción	Acilasa	Actividad Residual (%)
pH 8,8; 30 °C	tipo salvaje	103%
	L161T	106%
pH 9,5; 30 °C	tipo salvaje	98%
	L161T	102%
pH 8,8; 40 °C	tipo salvaje	88%
	L161T	99%
pH 9,5; 40 °C	tipo salvaje	66%
	L161T	76%

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> DSM IP Assets B.V

<120> Acilasas Mutantes

<130> 24988WO

5 <160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3141

<212> ADN

10 <213> Pseudomonas sp. SE83

<220>

<221> CDS

<222> (562)..(2886)

15 <400> 1

ES 2 571 865 T3

aagcttgcga tcgcggacgc cgctgccgcc ctgaagaaga ccgcctacaa gggcgagccg	60
gtggtcttcc tgacggtcgc cgggtcgatc tcgcagacgg ccggcgcggt tctggccagc	120
aatatgcgca aggccggctt caccgtggac gagcaggtga tggactgggg cacggtgctc	180
gcacgccggg ccaagaagga cggttggagc gtcttcccgg tctacgcaa cgcatcgac	240
atgatgtcgc cgctgacgca tttctacatc ggcaacaact gcgcgaacta tgccggctgg	300
agctgcgacg ccgtcatcac ccaaagctc gccgcctatg ccaaggcgcc tgatccggcc	360
acccgcaagc gcatcgcggc cgagatcagg tcgaggccta taaggacacg cctcccgta	420
tgtggggcca gttcagccgg ccggccggat accgcctcgc cctcaaagac atcgtccagt	480
ccagcttccg atcttctggc agctcacgct cgacgcgtga gctcgtccag atccccgataa	540
gcaacgaggt ccagacagag a atg acg atg gcg gcc aag acc gat cgc gag	591
Met Thr Met Ala Ala Lys Thr Asp Arg Glu	1
gcc ctg cag gcg gcg ctg ccg ccg ctt tcc ggc agc ctc tcc att ccc	639
Ala Leu Gln Ala Ala Leu Pro Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ser Ile Pro	15 20 25
gga ttg agc gcg ccg gtc cgt gtc cag cgc gat ggc tgg ggc atc ccg	687
Gly Leu Ser Ala Pro Val Arg Val Gln Arg Asp Gly Trp Gly Ile Pro	30 35 40
cat atc aag gcc tcg ggc gag gcc gat gcc tat cgc gcg ctg ggc ttc	735
His Ile Lys Ala Ser Gly Glu Ala Asp Ala Tyr Arg Ala Leu Gly Phe	45 50 55
gtc cat gcg cag gac cgc ctt ttc cag atg gaa ctg acg cgc cgc aag	783
Val His Ala Gln Asp Arg Leu Phe Gln Met Glu Leu Thr Arg Arg Lys	60 65 70
gcg ctg ggt cgc gcg gcc gaa tgg ctg ggc gcc gag gca gcc gag gcc	831
Ala Leu Gly Arg Ala Ala Glu Trp Leu Gly Ala Glu Ala Ala Glu Ala	75 80 85 90
gat atc ttg gtg cgc cgg ctc ggc atg gaa aaa gtc tgc cgg cgc gat	879
Asp Ile Leu Val Arg Arg Leu Gly Met Glu Lys Val Cys Arg Arg Asp	95 100 105
ttc gag gcc ctg ggt gcc gag gcg aag gac atg ctg cgg gcc tat gtc	927
Phe Glu Ala Leu Gly Ala Glu Ala Lys Asp Met Leu Arg Ala Tyr Val	110 115 120
gcc gcc gtg aac gcg ttc ctg gct tcc ggt gct cct ttg ccc atc gaa	975
Ala Gly Val Asn Ala Phe Leu Ala Ser Gly Ala Pro Leu Pro Ile Glu	125 130 135



ES 2 571 865 T3

tat ggc ctg ctc ggc gcc gaa ccg gag ccc tgg gaa ccc tgg cac agc	1023
Tyr Gly Leu Leu Gly Ala Glu Pro Glu Pro Trp Glu Pro Trp His Ser	
140 145 150	
atc gcc gtg atg cgg cgg ctg ggg ctc ctg atg ggc tcc gtc tgg ttc	1071
Ile Ala Val Met Arg Arg Leu Gly Leu Leu Met Gly Ser Val Trp Phe	
155 160 165	
aag ctc tgg cgg atg ctg gcg ctg ccg gtg gtc gga gcc gcg aat gcg	1119
Lys Leu Trp Arg Met Leu Ala Leu Pro Val Val Gly Ala Ala Asn Ala	
175 180 185	
ctg aag ctg cgc tat gac gat ggc ggc caa gac ctg ctc tgc atc ccg	1167
Leu Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Gly Gly Gln Asp Leu Leu Cys Ile Pro	
190 195 200	
ccg ggt gtc gag gcc gag cgg ctc gaa gcg gat ctc gcg gcg ctg agg	1215
Pro Gly Val Glu Ala Glu Arg Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ala Leu Arg	
205 210 215	
ccc gcg gtt gat gcc ctg ctg aaa gcg atg ggc ggc gac gcc tcc gat	1263
Pro Ala Val Asp Ala Leu Leu Lys Ala Met Gly Gly Asp Ala Ser Asp	
220 225 230	
gcg gcc ggc ggc ggc agc aac aac tgg gcg gtc gcg ccg ggc cgc acg	1311
Ala Ala Gly Gly Gly Ser Asn Asn Trp Ala Val Ala Pro Gly Arg Thr	
235 240 245 250	
gcg acg ggc cgg ccc atc ctc gcg ggc gat ccg cat cgc gtc ttc gaa	1359
Ala Thr Gly Arg Pro Ile Leu Ala Gly Asp Pro His Arg Val Phe Glu	
255 260 265	
atc ccc ggc atg tat gcg cag cat cac ctg gcc tgc gat cgg ttc gac	1407
Ile Pro Gly Met Tyr Ala Gln His His Leu Ala Cys Asp Arg Phe Asp	
270 275 280	
atg atc ggt ctg acc gtg ccg ggt gtg ccg ggc ttc ccg cat ttc gcg	1455
Met Ile Gly Leu Thr Val Pro Gly Val Pro Gly Phe Pro His Phe Ala	
285 290 295	
cat aac ggc aag gtc gcc tac tgc gtc acc cat gcc ttc atg gac att	1503
His Asn Gly Lys Val Ala Tyr Cys Val Thr His Ala Phe Met Asp Ile	
300 305 310	
cac gat ctc tat ctc gag caa ttc gcg gag gac ggg cgc acg gcg cgg	1551
His Asp Leu Tyr Leu Glu Gln Phe Ala Glu Asp Gly Arg Thr Ala Arg	
315 320 325 330	
ttc ggc aac gag ttc gag ccc gta gcc tgg gcg cga gac cgt atc gcg	1599
Phe Gly Asn Glu Phe Glu Pro Val Ala Trp Arg Arg Arg Asp Arg Ile Ala	
335 340 345	
gtc cgg ggt ggc gcc gat gcg gaa ttc gat atc gtc gag acg cgc cat	1647
Val Arg Gly Gly Ala Asp Arg Glu Phe Asp Ile Val Glu Thr Arg His	
350 355	
ggc ccc gtc atc gcg ggc gat ccg ctc gag gga gca gcg ctc acg ctg	1695
Gly Pro Val Ile Ala Gly Asp Pro Leu Glu Gly Ala Ala Leu Thr Leu	
365 370 375	
cgc tcg gtc cag ttc gcc gag acc gac ctt tcc ttc gat tgc ctg acg	1743
Arg Ser Val Gln Phe Ala Glu Thr Asp Leu Ser Phe Asp Cys Leu Thr	
380 385 390	
cgg atg ccg ggc gca tcg acc gtg gcg cag ctt tac gac gcg acg cgc	1791
Arg Met Pro Gly Ala Ser Thr Val Ala Gln Leu Tyr Asp Ala Thr Arg	
395 400 405 410	
ggc tgg ggc ctg atc gac cat aat ctc gtc gcc ggg gat gtc gcg ggc	1839
Gly Trp Gly Leu Ile Asp His Asn Leu Val Ala Gly Asp Val Ala Gly	
415 420 425	
tcg atc ggc cat ctg gtc cgc gcc cgc gtc ccg tcc cgc ccg cgc gag	1887
Ser Ile Gly His Leu Val Arg Ala Arg Val Pro Ser Arg Pro Arg Glu	
430 435 440	

ES 2 571 865 T3

aac ggc tgg ctg ccg gtg ccg ggc tgg tcc ggc gag cat gaa tgg cgc 1935  
 Asn Gly Trp Leu Pro Val Pro Gly Trp Ser Gly Glu His Glu Trp Arg  
 445 450 455

ggc tgg att ccg cac gag gcg atg ccg cgc gtc atc gat ccg ccg ggc 1983  
 Gly Trp Ile Pro His Glu Ala Met Pro Arg Val Ile Asp Pro Pro Gly  
 460 465 470

ggc ctc atc gtc acg gcg aac aac cgc gtc gtg gcc gat gat cat ccc 2031  
 Gly Leu Ile Val Thr Ala Asn Asn Arg Val Val Ala Asp Asp His Pro  
 475 480 485 490

gat tat ctc tgt acc gat tgc cat ccg ccc tac cgc gcc gaa cgg atc 2079  
 Asp Tyr Leu Cys Thr Asp Cys His Pro Pro Tyr Arg Ala Glu Arg Ile  
 495 500 505

atg gag cgc ctg gtc gcc agt ccg gct ttc gcc gtc gac gat cgc gcc 2127  
 Met Glu Arg Leu Val Ala Ser Pro Ala Phe Ala Val Asp Asp Ala Ala  
 510 515 520

gcg atc cac gcc gat acg ctg tcc ccc cat gtc ggc ttg ctg cgc gcg 2175  
 Ala Ile His Ala Asp Thr Leu Ser Pro His Val Gly Leu Leu Arg Ala  
 525 530 535

agg ctc gaa gcg ctc gga atc cag ggc agt ctc cct gcc gaa gag ttg 2223  
 Arg Leu Glu Ala Leu Gly Ile Gln Gly Ser Leu Pro Ala Glu Glu Leu  
 540 545 550

agg cag acc ctc atc gcc tgg gac ggc cgc atg gat gct ggc tcg cag 2271  
 Arg Gln Thr Leu Ile Ala Trp Asp Gly Arg Met Asp Ala Gly Ser Gln  
 555 560 565 570

gcg gct tcc gct tat aat gcg ttc cgc agg gcg ctg acg cgg ctg gta 2319  
 Ala Ala Ser Ala Tyr Asn Ala Phe Arg Arg Ala Leu Thr Arg Leu Val  
 575 580 585

acg gcc cgc agc ggg ctg gag caa gcg ata gcg cat ccc ttc gcg gcc 2367  
 Thr Ala Arg Ser Gly Leu Glu Gln Ile Ala His Pro Phe Ala Ala  
 590 595 600

gtc ccg ccc ggc gtc tcg ccg cag ggg cag gtc tgg tgg gcc gtg ccg 2415  
 Val Pro Pro Gly Val Ser Pro Gln Gly Gln Val Trp Trp Ala Val Pro  
 605 610 615

acc ctg ctg cgc aac gac gat gcc ggg atg ctg aaa ggc tgg agc tgg 2463  
 Thr Leu Leu Arg Asn Asp Ala Gly Met Leu Lys Gly Trp Ser Trp  
 620 625 630

gac gag gcc ttg tcg gag gcc ctg tcc gtc gcg acg cag aac ctg acc 2511  
 Asp Glu Ala Leu Ser Glu Ala Leu Ser Val Ala Thr Gln Asn Leu Thr  
 635 640 645 650

ggg cgc gcc tgg ggc gag gag cat ccg ccg cgt ttc acg cac ccg ctc 2559  
 Gly Arg Gly Trp Gly Glu Glu His Arg Pro Arg Phe Thr His Pro Leu  
 655 660 665

tcc gcg cag ttc ccg gcc tgg gcc gcg ctg ctg aac ccg gtt tcg cgc 2607  
 Ser Ala Gln Phe Pro Ala Trp Ala Ala Leu Leu Asn Pro Val Ser Arg  
 670 675 680

ccg atc ggc ggc gat ggc gac acc gtg ctg gcg aac ggg ctc gtc cca 2655  
 Pro Ile Gly Gly Asp Gly Asp Thr Val Leu Ala Asn Gly Leu Val Pro  
 685 690 695

tcg gcc gga cct gag gcg acc tat ggc gcc ctg tcg cgc tac gtc ttc 2703  
 Ser Ala Gly Pro Glu Ala Thr Tyr Gly Ala Leu Ser Arg Tyr Val Phe  
 700 705 710

gat gtc gcc aat tgg gac aat agc cgc tgg gtc gtc ttc cac ggc gcc 2751  
 Asp Val Gly Asn Trp Asp Asn Ser Arg Trp Val Val Phe His Gly Ala  
 715 720 725 730

tcg ggg cat ccg gcc agc ccc cac tat gcc gac cag aat gcg cca tgg 2799  
 Ser Gly His Pro Ala Ser Pro His Tyr Ala Asp Gln Asn Ala Pro Trp  
 735 740 745

ES 2 571 865 T3

```

agc gac tgc gcg atg gtg ccg atg ctc tat agc tgg gac agg atc gcc      2847
Ser Asp Cys Ala Met Val Pro Met Leu Tyr Ser Trp Asp Arg Ile Ala
      750                               755                               760

gcg gag gcc gtg acc tcg cag gaa ctc gtc ccg gcc tga ggggcaaggc      2896
Ala Glu Ala Val Thr Ser Gln Glu Leu Val Pro Ala
      765                               770

tgcggtcagc ctgccgcagc attcttgccg caggcgcggg tgcgtaagcc cgctgtttcg      2956

ccgccgtcga cggtcaggac ggcgccgttc acatagctcg acgcgtcggg caggagccag      3016

gccgcgagat cggcgacctc gtccggcgtg ccgagccggc ctgccggaat gcgcagctca      3076

agctgctcca gccgcagcgg gtcggccagc accttgtcca tcatccgcgt cgcgatctgc      3136

ccggg                                                                    3141

```

<210> 2  
 <211> 2847  
 < 212> ADN  
 < 213> Brevundimonas diminuta N-176

5

<220>  
 < 221> CDS  
 < 222> (483)..(2801)

<400> 2

ES 2 571 865 T3

```

cccggggatc tgcgagacgg ctggcgcggg cctggccagc aatatgcgca aggccggctt      60
cacggtggaa cagcaggtga tggattgggg cacggtgctc gcccgccggg ccaagaagga      120
cggctggagc gttttcccg tctacgcaa cggcatcgac atgatgtcgc cgctgacgca      180
tttctacatc ggcaacaact gcgtgaacta tgcgggctgg agctgcgacg ccgtcatcac      240
cgaaaagctc gccgctatg ccaaggcgcc cgatccggct acccgcaaac gcatcgcggc      300
cgaaatccag gtcgaggcct acaaggacac gccctccgtg atgtggggcc agttcagccg      360
gccggcgggc taccgcctgc gcctcaagaa catcgtccag tccagcttcc cgatcttctg      420
gcagctcagc ctcgacgcgt gagcttgccc agattccgac aagcaatgag gtcccgcgcg      480
ga atg act atg gcg gcc aac acc gat cgc gcg gtc ttg cag gcg gcg      527
  Met Thr Met Ala Ala Asn Thr Asp Arg Ala Val Leu Gln Ala Ala
    1          5          10          15

ctg ccg ccg ctt tcc gcc agc ctc ccc att ccc gga ttg agc gcg tcg      575
Leu Pro Pro Leu Ser Gly Ser Leu Pro Ile Pro Gly Leu Ser Ala Ser
          20          25          30

gtc cgc gtc cgg cgc gat gcc tgg gcc atc ccg cat atc aag gcc tcg      623
Val Arg Val Arg Arg Asp Ala Trp Gly Ile Pro His Ile Lys Ala Ser
          35          40          45

ggc gag gcc gat gcc tat cgg gcg ctg gcc ttc gtc cat tcg cag gac      671
Gly Glu Ala Asp Ala Tyr Arg Ala Leu Gly Phe Val His Ser Gln Asp
          50          55          60

cgt ctt ttc cag atg gag ctg acg cgt cgc aag gcg ctg gga cgc gcg      719
Arg Leu Phe Gln Met Glu Leu Thr Arg Arg Lys Ala Leu Gly Arg Ala
          65          70          75

gcc gaa tgg ctg gcc gcc gag gcc gcc gag gcc gat atc ctc gtg cgc      767
Ala Glu Trp Leu Gly Ala Glu Ala Ala Glu Ala Asp Ile Leu Val Arg
          80          85          90          95

cgg ctc gga atg gaa aaa gtc tgc cgg cgc gac ttc gag gcc ttg gcc      815
Arg Leu Gly Met Glu Lys Val Cys Arg Arg Asp Phe Glu Ala Leu Gly
          100          105          110

```

ES 2 571 865 T3

gtc Val	gag Glu	gcg Ala	aag Lys 115	gac Asp	atg Met	ctg Leu	cgg Arg	gct Ala 120	tat Tyr	gtc Val	gcc Ala	ggc Gly 125	gtg Val 125	aac Asn	gca Ala	863
ttc Phe	ctg Leu	gct Ala 130	tcc Ser	ggt Gly	gct Ala	ccc Pro	ctg Leu 135	cct Pro	gtc Val	gaa Glu	tac Tyr	gga Gly 140	ttg Leu	ctc Leu	gga Gly	911
gca Ala	gag Glu	ccg Pro	gag Glu	ccc Pro	tgg Trp 150	gag Glu	cct Pro	tgg Trp	cac His	agc Ser	atc Ile 155	gcg Ala	gtg Val	atg Met	cgc Arg	959
arg Arg	ctg Leu	ggc Gly	ctg Leu	ctt Leu	atg Met 165	ggt Gly	tgc Ser	gtg Val	tgg Trp	ttc Phe 170	aag Lys	ctc Leu	tgg Trp	cgc Arg	atc Ile 175	1007
ctg Leu	gcg Ala	ctg Leu	ccg Pro	gtg Val 180	gtc Val	gga Gly	gcc Ala	gcc Ala	aat Asn 185	gcg Ala	ctg Leu	aag Lys	ctg Leu	cgc Arg	tat Tyr 190	1055
gac Asp	gat Asp	ggc Gly 195	ggc Gly	cgg Arg	gat Asp	ttg Leu	ctc Leu	tgc Cys 200	atc Ile	ccg Pro	ccg Pro	ggc Gly 205	gcc Ala 205	gaa Glu	gcc Ala	1103
gat Asp	cgg Arg	ctc Leu 210	gag Glu	gcg Ala	gat Asp	ctc Leu 215	gcg Ala	acc Thr	ctg Leu	cgg Arg	ccc Pro	gcg Ala 220	gtc Val	gat Asp	cgc Ala	1151
ctg Leu	ctg Leu 225	aag Lys	gcg Ala	atg Met	ggc Gly	ggc Gly 230	gat Asp	gcc Ala	tcc Ser	gat Asp	gct Ala 235	gcc Ala	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	1199
agc Ser 240	aac Asn	aac Asn	tgg Trp	gcg Ala	gtc Val 245	gct Ala	ccg Pro	ggc Gly	cgc Arg	acg Thr 250	gcg Ala	acc Thr	ggc Gly	agg Arg	ccg Pro 255	1247
atc Ile	ctc Leu	gcg Ala	ggc Gly	gat Asp 260	ccg Pro	cat His	cgc Arg	gtc Val	ttc Phe 265	gaa Glu	atc Ile	ccg Pro	ggc Gly	atg Met 270	tat Tyr	1295
gcg Ala	cag Gln	cat His 275	cat His	ctg Leu	gcc Ala	tgc Cys	gac Asp	cgg Arg 280	ttc Phe	gac Asp	atg Met	atc Ile 285	ggc Gly	ctg Leu	acc Thr	1343
gtg Val	ccg Pro	ggc Gly 290	gtg Val	ccg Pro	ggc Gly	ttc Phe 295	ccg Pro	cac His	ttc Phe	gcg Ala	cat His	aac Asn 300	ggc Gly	aag Lys	gtc Val	1391
gcc Ala	tat Tyr 305	tgc Cys	gtc Val	acc Thr	cat His	gcc Ala 310	ttc Phe	atg Met	gac Asp	atc Ile	cac His 315	gat Asp	ctc Leu	tat Tyr	ctc Leu	1439
gag Glu 320	cag Gln	ttc Phe	gcg Ala	ggg Gly	gag Glu 325	ggc Gly	cgc Arg	act Thr	gcg Ala	cgg Arg 330	ttc Phe	ggc Gly	aac Asn	gat Asp	ttc Phe 335	1487
gag Glu	ccc Pro	gtc Val	gcc Ala	tgg Trp 340	agc Ser	cgg Arg	gac Asp	cgt Arg	atc Ile 345	gcg Ala	gtc Val	cgg Arg	ggt Gly	ggc Gly	gcc Ala 350	1535
gat Asp	cgc Arg	gag Glu	ttc Phe 355	gat Asp	atc Ile	gtc Val	gag Glu	acg Thr 360	cgc Arg	cat His	ggc Gly	ccg Pro	ggt Val 365	atc Ile	cgc Ala	1583
ggc Gly	gat Asp	ccg Pro 370	cgc Arg	gat Asp	ggc Gly	gca Ala	gcg Ala 375	ctc Leu	acg Thr	ctg Leu	cgt Arg	tgc Ser 380	gtc Val	cag Gln	ttc Phe	1631
gcc Ala	gag Glu 385	acc Thr	gat Asp	ctg Leu	tcc Ser	ttc Phe 390	gac Asp	tgc Cys	ctg Leu	acg Thr	cgg Arg 395	atg Met	ccg Pro	ggc Gly	gca Ala	1679
tgc Ser 400	acc Thr	gtg Val	gcc Ala	cag Gln	ctc Leu 405	tac Tyr	gac Asp	gcg Ala	acg Thr	cgc Arg 410	ggc Gly	tgg Trp	ggc Gly	ctg Leu	atc Ile 415	1727

ES 2 571 865 T3

gac Asp	cat His	aac Asn	ctc Leu	gtc Val 420	gcc Ala	ggg Gly	gat Asp	gtc Val 425	gcg Ala 425	ggc Gly	tcg Ser	atc Ile	ggc Gly 430	cat His	ctg Leu	1775
gtc Val	cgc Arg	gcc Ala	cgc Arg 435	ggt Val	ccg Pro	tcc Ser	cgt Arg	ccg Pro 440	cgc Arg	gaa Glu	aac Asn	ggc Gly 445	tgg Trp 445	ctg Leu	ccg Pro	1823
gtg Val	ccg Pro	ggc Gly 450	tgg Trp	tcc Ser	ggc Gly	gag Glu	cat His 455	gaa Glu	tgg Trp	cgg Arg	ggc Gly 460	tgg Trp 460	att Ile	ccg Pro	cac His	1871
gag Glu	gcg Ala 465	atg Met	ccg Pro	cgc Arg	gtg Val	atc Ile 470	gat Asp	ccg Pro	ccg Pro	ggc Gly 475	ggc Gly 475	atc Ile	atc Ile	gtc Val	acc Thr	1919
gcg Ala 480	aat Asn	aat Asn	cgc Arg	gtc Val 485	gtg Val 485	gcc Ala	gat Asp	gac Asp	cat His	ccc Pro 490	gat Asp	tat Tyr	ctc Leu	tgc Cys	acc Thr 495	1967
gat Asp	tgc Cys	cat His	ccg Pro	ccc Pro 500	tac Tyr	cgc Arg	gcc Ala	gag Glu	cgc Arg 505	atc Ile	atg Met	aag Lys	cgc Arg	ctg Leu 510	gtc Val	2015
gcc Ala	aat Asn	ccg Pro	gct Ala 515	ttc Phe	gcc Ala	gtc Val	gac Asp	gat Asp 520	gcc Ala	gcc Ala	gcg Ala	atc Ile	cat His 525	gcc Ala	gat Asp	2063
acc Thr	ctg Leu	tcg Ser 530	ccc Pro	cat His	gtc Val	ggg Gly	tgg Leu 535	ctg Leu	cgc Arg	cgg Arg	agg Arg	ctc Leu 540	gag Glu	gcg Ala	ctt Leu	2111
gga Gly 545	gcc Ala	cgc Arg	gac Asp	gac Asp	tcc Ser 550	gcg Ala 550	gcc Ala	gaa Glu	ggg Gly	ctg Leu 555	agg Arg 555	cag Gln	atg Met	ctc Leu	gtc Val	2159
gcc Ala 560	tgg Trp	gac Asp	ggc Gly	cgc Arg	atg Met 565	gat Asp	gcg Ala	gct Ala	tcg Ser	gag Glu 570	gtc Val	gcg Ala	tct Ser	gcc Ala	tac Tyr 575	2207
aat Asn	gcg Ala	ttc Phe	cgc Arg	agg Arg 580	gcg Ala	ctg Leu	acg Thr	cgg Arg	ctg Leu 585	gtg Val	acc Thr	gac Asp	cgc Arg	agc Ser 590	ggg Gly	2255
ctg Leu	gag Glu	cag Gln 595	gcg Ala	ata Ile	tcg Ser	cat His	ccc Pro	ttc Phe 600	gcg Ala	gct Ala	gtc Val	gcg Ala	ccg Pro 605	ggc Gly	gtc Val	2303
tca Ser	ccg Pro	caa Gln 610	ggc Gly	cag Gln	gtc Val	tgg Trp	tgg Trp 615	gcc Ala	gtg Val	ccg Pro	acc Thr	ctg Leu 620	ctg Leu	cgc Arg	gac Asp	2351
gac Asp	gat Asp 625	gcc Ala	gga Gly	atg Met	ctg Leu	aag Lys 630	ggc Gly	tgg Trp	agc Ser	tgg Trp	gac Asp 635	cag Gln	gcc Ala	tgg Leu	tct Ser	2399
gag Glu 640	gcc Ala	ctc Leu	tcg Ser	gtc Val 645	gcg Ala	tcg Ser	cag Gln	aac Asn	ctg Leu	acc Thr 650	ggg Gly	cga Arg	agc Ser	tgg Trp	ggc Gly 655	2447
gaa Glu	gag Glu	cat His	cgg Arg	ccg Pro 660	cgc Arg	ttc Phe	acg Thr	cat His	ccg Pro 665	ctt Leu	gcc Ala	acg Thr	caa Gln	ttc Phe 670	ccg Pro	2495
gcc Ala	tgg Trp	gcg Ala	ggg Gly 675	ctg Leu	ctg Leu	aat Asn	ccg Pro	gct Ala 680	tcc Ser	cgt Arg	ccg Pro	atc Ile	ggt Gly 685	ggc Gly	gat Asp	2543
ggc Gly	gat Asp	acc Thr 690	gtg Val	ctg Leu	gcg Ala	aac Asn	ggg Gly 695	ctc Leu	gtc Val	ccg Pro	tca Ser	gcc Ala 700	ggg Gly	ccg Pro	cag Gln	2591
gcg Ala 705	acc Thr	tat Tyr	ggt Gly	gcc Ala	ctg Leu	tcg Ser 710	cgc Arg	tac Tyr	gtc Val	ttc Phe	gat Asp 715	gtc Val	ggc Gly	aat Asn	tgg Trp	2639

ES 2 571 865 T3

gac aat agc cgc tgg gtc gtc ttc cac ggc gcc tcc ggg cat ccg gcc	2687
Asp Asn Ser Arg Trp Val Val Phe His Gly Ala Ser Gly His Pro Ala	
720 725 730 735	
agc gcc cat tat gcc gat cag aat gcg ccc tgg agc gac tgt gcg atg	2735
Ser Ala His Tyr Ala Asp Gln Asn Ala Pro Trp Ser Asp Cys Ala Met	
740 745 750	
gtg ccg atg ctc tat agc tgg gac agg atc gcg gca gag gcc gtg acg	2783
Val Pro Met Leu Tyr Ser Trp Asp Arg Ile Ala Ala Glu Ala Val Thr	
755 760 765	
tcg cag gaa ctc gtc ccg gcctgagggc cgggcctggt gtcagcctgc	2831
Ser Gln Glu Leu Val Pro	
770	
cgcagctctc ttcggc	2847

<210> 3  
 <211> 2325  
 < 212> ADN  
 < 213> Brevundimonas diminuta V22

5

<220>  
 < 221> CDS  
 < 222> (1)..(2322)

<400> 3

ES 2 571 865 T3

atg Met 1	act Thr	atg Met	gct Ala 5	gcc Ala	aac Asn	acc Thr	gat Asp	cgc Arg	gcc Ala 10	gtc Val	ttg Leu	cag Gln	gcg Ala 15	gcg Ala	ctg Leu	48
ccg Pro	ccg Pro	ctt Leu	tcc Ser 20	ggc Gly	agc Ser	ctc Leu	ccc Pro	att Ile 25	ccc Pro	gga Gly	ttg Leu	agc Ser	gcg Ala 30	tcg Ser	gtc Val	96
cct Pro	atc Ile	cag Gln 35	gcg Arg	gat Asp	gcc Ala	tgg Trp	ggc Gly 40	atc Ile	ccg Pro	cat His	atc Ile	aag Lys 45	gcc Ala	tcc Ser	ggc Gly	144
gag Glu 50	gcc Ala	gat Asp	gcc Ala	tat Tyr	cgc Arg	gcg Ala 55	ctg Leu	ggc Gly	ttc Phe	gtc Val	cat His 60	gcg Ala	cag Gln	gac Asp	cgc Arg	192
ctt Leu 65	ttc Phe	cag Gln	atg Met	gag Glu 70	ctg Leu	acg Thr	cg Arg	cgc Arg	aag Lys	gcg Ala 75	ctg Leu	gga Gly	gcg Arg	gcg Ala 80	gcc Ala	240
gaa Glu	tgg Trp	ctg Leu	ggt Gly	gcc Ala 85	gag Glu	gcc Ala	gcc Ala	gag Glu	gcc Ala 90	gat Asp	atc Ile	ctc Leu	gtg Val	cg Arg 95	cg Arg	288
ctc Leu	ggt Gly	atg Met	gaa Glu 100	aaa Lys	gtc Val	tgc Cys	cga Arg	cgc Arg 105	gat Asp	ttc Phe	gag Glu	gcc Ala	ctg Leu 110	ggc Gly	gcc Ala	336
gag Glu	gcg Ala	aag Lys 115	gac Asp	atg Met	ctc Leu	cg Arg	gcc Ala 120	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala	ggc Gly	gtg Val 125	aac Asn	gca Ala	ttc Phe	384
ctg Leu 130	gct Ala	tcc Ser	ggt Gly	ggt Val	ccc Pro	ctg Leu 135	cct Pro	gtc Val	gaa Glu	tac Tyr	gga Gly 140	ttg Leu	ctc Leu	gga Gly	gca Ala	432
gag Glu 145	ccg Pro	gag Glu	ccc Pro	tgg Trp	gag Glu 150	cct Pro	tgg Trp	cac His	agc Ser	atc Ile 155	gcg Ala	gtg Val	atg Met	cg Arg 160	cg Arg	480
ctg Leu	ggc Gly	ctg Leu	ctg Leu	atg Met 165	ggt Gly	tcg Ser	gtc Val	tgg Trp	ttc Phe 170	aag Lys	ctc Leu	tgg Trp	cg Arg	atg Met 175	ctg Leu	528
gcg 1	ctg 2	ccg 3	gtg 4	gtc 5	gga 6	gcc 7	gcg 8	aat 9	gcg 10	ctg 11	aag 12	ctg 13	cg 14	tat 15	gac 16	576



ES 2 571 865 T3

Ala	Leu	Pro	Val 180	Val	Gly	Ala	Ala	Asn 185	Ala	Leu	Lys	Leu	Arg 190	Tyr	Asp		
gat	ggc	ggc	cgc	gat	ttg	ctc	tgc	atc	ccg	ccg	cgc	gcc	gaa	gcg	gat	624	
Asp	Gly	Gly 195	Arg	Asp	Leu	Leu	Cys 200	Ile	Pro	Pro	Arg	Ala 205	Glu	Ala	Asp		
cgg	ctc	gag	gcg	gat	ctc	ggc	acc	ctg	cgg	ccc	ggc	gtc	gat	gcg	ctg	672	
Arg	Leu	Glu 210	Ala	Asp	Leu	Ala 215	Thr	Leu	Arg	Pro	Ala 220	Val	Asp	Ala	Leu		
ctg	aag	gcg	atg	ggc	ggg	gat	gcc	tca	gat	gcc	gcc	ggt	ggc	ggc	agc	720	
Leu	Lys	Ala	Met	Gly	Gly 230	Asp	Ala	Ser	Asp	Ala 235	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser 240		
aac	aac	tgg	gcg	gtc	gcg	ccg	ggc	cgt	acg	gcg	acc	ggc	cgg	ccg	atc	768	
Asn	Asn	Trp	Ala	Val 245	Ala	Pro	Gly	Arg	Thr 250	Ala	Thr	Gly	Arg	Pro	Ile 255		
ctc	gcg	ggc	gat	ccg	cat	cgc	gtc	ttc	cag	atc	ccc	ggc	atg	tat	gcc	816	
Leu	Ala	Gly	Asp	Pro	His	Arg	Val	Phe 265	Gln	Ile	Pro	Gly	Met	Tyr 270	Ala		
cag	cat	cat	ctg	gcc	tgc	gat	cgc	ttc	gac	atg	atc	ggc	ctg	acc	gtg	864	
Gln	His	His 275	Leu	Ala	Cys	Asp	Arg 280	Phe	Asp	Met	Ile	Gly 285	Leu	Thr	Val		
ccg	ggc	gtg	ccg	ggt	ttt	ccg	cat	ttc	gcg	cat	aac	ggc	aag	gtc	gcc	912	
Pro	Gly	Val 290	Pro	Gly	Phe	Pro 295	His	Phe	Ala	His	Asn 300	Gly	Lys	Val	Ala		
tac	tgc	gtc	acc	cat	gcc	ttc	atg	gac	att	cac	gat	ctc	tac	ctt	gag	960	
Tyr	Cys	Val	Thr	His	Ala 310	Phe	Met	Asp	Ile	His 315	Asp	Leu	Tyr	Leu	Glu 320		
cag	ttc	gcg	gag	gag	ggc	cgc	agg	gcg	cgg	ttc	ggc	aac	gat	ttc	gag	1008	
Gln	Phe	Ala	Glu	Glu 325	Gly	Arg	Arg	Ala 330	Arg	Phe	Gly	Asn	Asp	Phe 335	Glu		
ccc	gcc	gcc	tgg	agc	ccg	gac	cgt	atc	gcg	gtc	cgg	ggt	ggt	gcc	gac	1056	
Pro	Ala	Ala	Trp 340	Ser	Arg	Asp	Arg 345	Ile	Ala	Val	Arg	Gly	Gly 350	Ala	Asp		
gcg	gaa	ttc	gat	atc	atc	gag	acg	cgc	cat	ggt	ccc	gtc	ata	gca	ggc	1104	
Arg	Glu	Phe 355	Asp	Ile	Ile	Glu	Thr 360	Arg	His	Gly	Pro	Val 365	Ile	Ala	Gly		
gat	ccg	gcg	gat	ggc	gca	gcg	ctc	acg	ctg	gcg	tcg	gtc	cag	ttc	gcc	1152	
Asp	Pro	Arg	Asp	Gly 370	Ala 375	Ala 375	Leu	Thr	Leu	Arg	Ser 380	Val	Gln	Phe	Ala		
gag	acc	gat	ctg	tcc	ttc	gat	tgc	ctg	acg	cgg	atg	ccg	ggc	gca	tcg	1200	
Glu	Thr	Asp	Leu	Ser 390	Asp	Cys	Leu	Thr	Thr	Arg 395	Met	Pro	Gly	Ala	Ser 400		
acc	gtg	gcg	cag	ctc	tac	gac	gcg	acg	cgc	ggc	tgg	ggc	ctg	atc	gac	1248	
Thr	Val	Ala	Gln	Leu 405	Tyr	Asp	Ala	Thr	Arg 410	Gly	Trp	Gly	Leu	Ile 415	Asp		
cat	aat	ctc	gtc	gcc	ggg	gat	gtc	ggg	ggc	tcg	atc	ggc	cat	ctg	gtc	1296	
His	Asn	Leu 420	Val	Ala	Gly	Asp	Val 425	Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	His 430	Leu	Val		
gcg	gcc	cgt	gtc	ccg	tcc	cgc	tcg	cgc	gaa	aac	ggc	tgg	ctg	ccg	gtg	1344	
Arg	Ala	Arg 435	Val	Pro	Ser	Arg 440	Ser	Arg	Glu	Asn	Gly	Trp 445	Leu	Pro	Val		
ccg	ggc	tgg	tcc	ggc	gag	cat	gaa	tgg	cgg	ggt	tgg	att	ccg	cac	gag	1392	
Pro	Gly	Trp 450	Ser	Gly	Glu 455	His 455	Glu	Trp	Arg	Gly	Trp 460	Ile	Pro	His	Glu		
gcg	atg	ccg	gcg	gtg	atc	gat	ccg	ccg	ggc	ggc	atc	atc	gtc	acg	gcg	1440	
Ala	Met	Pro	Arg	Val 470	Ile	Asp	Pro	Pro	Gly	Gly 475	Ile	Ile	Val	Thr	Ala 480		
aat	aat	cgc	gtc	gtg	gcc	gat	gac	cat	ccc	gat	tat	ctc	tgc	acc	gat	1488	

ES 2 571 865 T3

Asn	Asn	Arg	Val	Val	Ala	Asp	Asp	His	Pro	Asp	Tyr	Leu	Cys	Thr	Asp	
			485						490						495	
tgc	cat	ccg	ccc	tac	cgc	gcc	gag	ccc	atc	atg	aag	cgc	ctg	gtc	gcc	1536
Cys	His	Pro	Pro	Tyr	Arg	Ala	Glu	Pro	Ile	Met	Lys	Arg	Leu	Val	Ala	
			500					505					510			
aat	ccg	gct	ttc	gcc	gtc	gac	gat	gcc	gcc	gcg	atc	cat	gcc	gat	acg	1584
Asn	Pro	Ala	Phe	Ala	Val	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Ile	His	Ala	Asp	Thr	
		515					520					525				
ctg	tcg	ccc	cat	gtc	ggg	ttg	ctg	cgc	cgg	agg	ctc	gag	gcg	ctt	gga	1632
Leu	Ser	Pro	His	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Arg	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	
	530				535						540					
gcc	cgc	gac	gac	tcc	gcg	gcc	gaa	ggg	ctg	agg	cag	atg	ctc	gtc	gcc	1680
Ala	Arg	Asp	Asp	Ser	Ala	Ala	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Met	Leu	Val	Ala	
	545				550					555					560	
tgg	gac	ggc	cgc	atg	gat	gcg	gct	tcg	gag	gtc	gcg	tct	gcc	tac	aat	1728
Trp	Asp	Gly	Arg	Met	Asp	Ala	Ala	Ser	Glu	Val	Ala	Ser	Ala	Tyr	Asn	
				565					570					575		
gcg	ttc	cgc	agg	gcg	ctg	acg	cgg	ctg	gtg	acg	gac	cgc	agc	ggg	ctg	1776
Ala	Phe	Arg	Arg	Ala	Leu	Thr	Arg	Leu	Val	Thr	Asp	Arg	Ser	Gly	Leu	
			580					585					590			
gag	cag	gcg	ata	tcg	cat	ccc	ttc	gcg	gct	gtc	gcg	ccg	ggc	gtc	tca	1824
Glu	Gln	Ala	Ile	Ser	His	Pro	Phe	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	
		595					600					605				
ccg	caa	ggc	cag	gtc	tgg	tgg	gcc	gtg	ccg	acc	ctg	ctg	cgc	gac	gac	1872
Pro	Gln	Gly	Gln	Val	Trp	Trp	Ala	Val	Pro	Thr	Leu	Leu	Arg	Asp	Asp	
	610					615					620					
gat	gcc	gga	atg	ctg	aag	ggc	tgg	agc	tgg	gac	cag	gcc	ttg	tct	gag	1920
Asp	Ala	Gly	Met	Leu	Lys	Gly	Trp	Ser	Trp	Asp	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	
	625				630					635					640	
gcc	ctc	tcg	gtc	gcg	tcg	cag	aac	ctg	agc	cgg	cga	agc	tgg	ggc	gaa	1968
Ala	Leu	Ser	Val	Ala	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Arg	Arg	Ser	Trp	Gly	Glu	
			645						650					655		
gag	cat	cgg	ccg	cgc	ttc	acg	cat	ccg	ctt	gcc	acg	caa	ttc	ccg	gcc	2016
Glu	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Thr	Gln	Phe	Pro	Ala	
			660					665					670			
tgg	gcg	ggg	ctg	ctg	aat	ccg	gct	tcc	cgt	ccg	atc	ggc	ggc	gat	ggc	2064
Trp	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Pro	Ile	Gly	Gly	Asp	Gly	
		675				680						685				
gac	acc	gtg	ctg	gcg	aac	ggg	ctc	gtc	ccg	tca	gcc	ggg	ccg	cag	gcg	2112
Asp	Thr	Val	Leu	Ala	Asn	Gly	Leu	Val	Pro	Ser	Ala	Gly	Pro	Gln	Ala	
	690					695					700					
acc	tat	ggc	gcc	ctg	tcg	cgc	tac	gtc	ttt	gat	gtc	ggc	aat	tgg	gac	2160
Thr	Tyr	Gly	Ala	Leu	Ser	Arg	Tyr	Val	Phe	Asp	Val	Gly	Asn	Trp	Asp	
	705				710				715						720	
aat	agc	cgc	tgg	gtc	gtc	ttc	cac	ggc	gcc	tcc	ggg	cat	ccg	gcc	agc	2208
Asn	Ser	Arg	Trp	Val	Val	Phe	His	Gly	Ala	Ser	Gly	His	Pro	Ala	Ser	
			725					730						735		
gcc	cat	tat	gcc	gat	cag	aat	gcg	ccc	tgg	agc	gac	tgt	gcg	atg	gtg	2256
Ala	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Asn	Ala	Pro	Trp	Ser	Asp	Cys	Ala	Met	Val	
			740					745					750			
ccg	atg	ctc	tat	agc	tgg	gac	agg	atc	gcg	gca	gag	gcc	gtg	acg	tcg	2304
Pro	Met	Leu	Tyr	Ser	Trp	Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Glu	Ala	Val	Thr	Ser	
		755					760					765				
cag	gaa	ctc	gtc	ccg	gcc	tga										2325
Gln	Glu	Leu	Val	Pro	Ala											
	770															

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una acilasa de beta-lactama de tipo II mutante seleccionada del grupo que consiste en la acilasa SE83-acil de *Pseudomonas* según se representa en la SEQ ID NO: 1, N176 de *Brevundimonas diminuta* según se representa en la SEQ ID NO: 2 y la acilasa V22 de *Brevundimonas diminuta* según se representa en la SEQ ID NO: 3, y polipéptidos con actividad de acilasa de beta-lactama de tipo II que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a lo largo de toda su longitud con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, en donde dicha acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se caracteriza por que leucina en la posición 161 ha sido modificada en glicina, serina o treonina.
- 10 2. Acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una modificación en una posición seleccionada del grupo que consiste en 10, 29, 270, 274, 280, 296, 314, 442, 514, 589, 645, 694, 706 y 726, utilizando la numeración de la posición de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la acilasa SE83-acil de *Pseudomonas* según se representa en la SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de acuerdo con la reivindicación 2, en donde serina en la posición 29 ha sido modificada en arginina, asparagina, glutamina o lisina y en donde tirosina en la posición 706 ha sido modificada en alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina o valina.
4. Acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha acilasa de beta-lactama mutante tiene una actividad in vitro de acilasa de beta-lactama mejorada al menos 1,5 veces hacia adipil-7-ADCA en comparación con el polipéptido modelo con actividad de acilasa de beta-lactama.
- 20 5. Un polinucleótido que codifica la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un vector o casete de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.
7. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5 o el vector o la casete de expresión de la reivindicación 6.
- 25 8. Un método de producir la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 7 bajo condiciones que conducen a la producción de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante y recuperar el polipéptido.
- 30 9. Un procedimiento para la producción de 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, 7-ADAC o ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, que comprende desacilar un precursor acilado de 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, 7-ADAC o ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, respectivamente utilizando la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el grupo acilo de dicho precursor acilado es un ácido dicarboxílico.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se utiliza en una forma inmovilizada.
- 35 11. Uso de la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante de las reivindicaciones 1-4, para la desacilación de un precursor acilado de 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, 7-ADAC o ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el grupo acilo de dicho precursor acilado de 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, 7-ADAC o ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico es un ácido dicarboxílico.
13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde la acilasa de beta-lactama de tipo II mutante se utiliza en una forma inmovilizada.

SE83\_ACYII MTMAAKTDREALQAALPPLSGSLSIPGLSAPVVRVQRDVGWIPHIKASGEADAYRALGFVH 60  
N176\_CCAC MTMAANTDRAVLQAALPPLSGSLPIPGLSASVVRVRRDAWGIPHIKASGEADAYRALGFVH 60  
V22\_CCAC MTMAANTDRAVLQAALPPLSGSLPIPGLSASVPIQRDAWGIPHIKASGEADAYRALGFVH 60  
\*\*\*\*\*:\*\*\* .\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\* :\*.\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII AQDRLFQMELTRRKALGRAAEWLGAEEAEADILVRRLGMEKVCRRDFEALGAEAKMLRA 120  
N176\_CCAC SQDRLFQMELTRRKALGRAAEWLGAEEAEADILVRRLGMEKVCRRDFEALGVEAKMLRA 120  
V22\_CCAC AQDRLFQMELTRRKALGRAAEWLGAEEAEADILVRRLGMEKVCRRDFEALGAEAKMLRA 120  
:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII YVAGVNAFLASGAPLPIEYGLLGAEPEPWEPWHSIAVMRRLGLLMGSVWFKLWRMLALPV 180  
N176\_CCAC YVAGVNAFLASGAPLPEVEYGLLGAEPEPWEPWHSIAVMRRLGLLMGSVWFKLWRI LALPV 180  
V22\_CCAC YVAGVNAFLASGVPLPEVEYGLLGAEPEPWEPWHSIAVMRRLGLLMGSVWFKLWRMLALPV 180  
\*\*\*\*\* .\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII VGANALKLRYYDDGGQDLLCIPPGVEAERLEADLAALRPAVDALLKAMGGDASDAAGGS 240  
N176\_CCAC VGANALKLRYYDDGGRDLLCIPPGAADRLEADLATLRPAVDALLKAMGGDASDAAGGS 240  
V22\_CCAC VGANALKLRYYDDGGRDLLCIPPAEADRLEADLATLRPAVDALLKAMGGDASDAAGGS 240  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* .\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII NNWAVAPGRTATGRPILAGDPHRVFEIPGMYAQHHLACDRFDMIGLTVPGVPGFPHFAHN 300  
N176\_CCAC NNWAVAPGRTATGRPILAGDPHRVFEIPGMYAQHHLACDRFDMIGLTVPGVPGFPHFAHN 300  
V22\_CCAC NNWAVAPGRTATGRPILAGDPHRVFQIPGMYAQHHLACDRFDMIGLTVPGVPGFPHFAHN 300  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII GKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQFAEDGRTARFGNEFEPVAWRRDRIAVRGGADREFDIVET 360  
N176\_CCAC GKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQFAGEGRTARFGNDFEPVAWSRDRIAVRGGADREFDIVET 360  
V22\_CCAC GKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQFAEEGRRARFGNDFEPAAWSRDRIAVRGGADREFDI IET 360  
\*\*\*\*\* :\* \*\*\*\*\*:\*\*\* .\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*

SE83\_ACYII RHGPVIAGDPLEGAALTLRSVQFAETDLSFDCLTRMPGASTVAQLYDATRGWGLIDHNLV 420  
N176\_CCAC RHGPVIAGDPRDGAALTLRSVQFAETDLSFDCLTRMPGASTVAQLYDATRGWGLIDHNLV 420  
V22\_CCAC RHGPVIAGDPRDGAALTLRSVQFAETDLSFDCLTRMPGASTVAQLYDATRGWGLIDHNLV 420  
\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII AGDVAGSIGHLVRRARVPSRPRENGWLPVPGWSGEHEWRGWIPHEAMPRVIDPPGGIIVTA 480  
N176\_CCAC AGDVAGSIGHLVRRARVPSRPRENGWLPVPGWSGEHEWRGWIPHEAMPRVIDPPGGIIVTA 480  
V22\_CCAC AGDVGGSIGHLVRRARVPSRSRENGWLPVPGWSGEHEWRGWIPHEAMPRVIDPPGGIIVTA 480  
\*\*\*\* .\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII NNRVVADDPDYLCDCHPPYRAERIMERLVASPAFAVDDAAA IHADTLSPHVGLLRARL 540  
N176\_CCAC NNRVVADDPDYLCDCHPPYRAERIMKRLVANPAFAVDDAAA IHADTLSPHVGLLRARRL 540  
V22\_CCAC NNRVVADDPDYLCDCHPPYRAEPIMKRLVANPAFAVDDAAA IHADTLSPHVGLLRARRL 540  
\*\*\*\*\* \*\* :\*\*\*\* .\*\*\*\*\*

SE83\_ACYII EALGIQGSPLAEELRQTLIAWDGRMDAGSQAASAYNAFRRALTRLVTARSGLEQAI SHPF 600  
N176\_CCAC EALGARDDSAEGLRQMLVAWDGRMDAASEVASAYNAFRRALTRLVTDRSGLEQAI SHPF 600  
V22\_CCAC EALGARDDSAEGLRQMLVAWDGRMDAASEVASAYNAFRRALTRLVTDRSGLEQAI SHPF 600  
\*\*\*\* :.. .\*\* \*\*\* \*:\*\*\*\*\*.\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*

SE83\_ACYII AAVPPGVSPQGQVWVAVPTLLRND DAGMLKGWSWDEALSEALSVATQNL TGRGWGEEHRP 660  
N176\_CCAC AAVAPGVSPQGQVWVAVPTLLRDDDAGMLKGWSWDQALSEALSVASQNL TGRSWGEEHRP 660  
V22\_CCAC AAVAPGVSPQGQVWVAVPTLLRDDDAGMLKGWSWDQALSEALSVASQNL SRRSWGEEHRP 660

ES 2 571 865 T3

```
***_*****;*****;*****:***:*.*****  
  
SE83_ACYII RFTHPLSAQFPAWAALLNPVSRPIGGDGTVLANGLVPSAGPEATYGALSRYVFDVGNWD 720  
N176_CCAC RFTHPLATQFPAWAGLLNPASRPISGGDGTVLANGLVPSAGPQATYGALSRYVFDVGNWD 720  
V22_CCAC RFTHPLATQFPAWAGLLNPASRPISGGDGTVLANGLVPSAGPQATYGALSRYVFDVGNWD 720  
*****:*****.****_*****;*****  
  
SE83_ACYII NSRWVVFHGASGHPASPHYADQNAPWSDCAMVPMLYSWDRIAAEAVTSQELVPA- 774  
N176_CCAC NSRWVVFHGASGHPASAHYADQNAPWSDCAMVPMLYSWDRIAAEAVTSQELVPA- 774  
V22_CCAC NSRWVVFHGASGHPASAHYADQNAPWSDCAMVPMLYSWDRIAAEAVTSQELVPAX 775  
*****_*****
```

Fig. 1

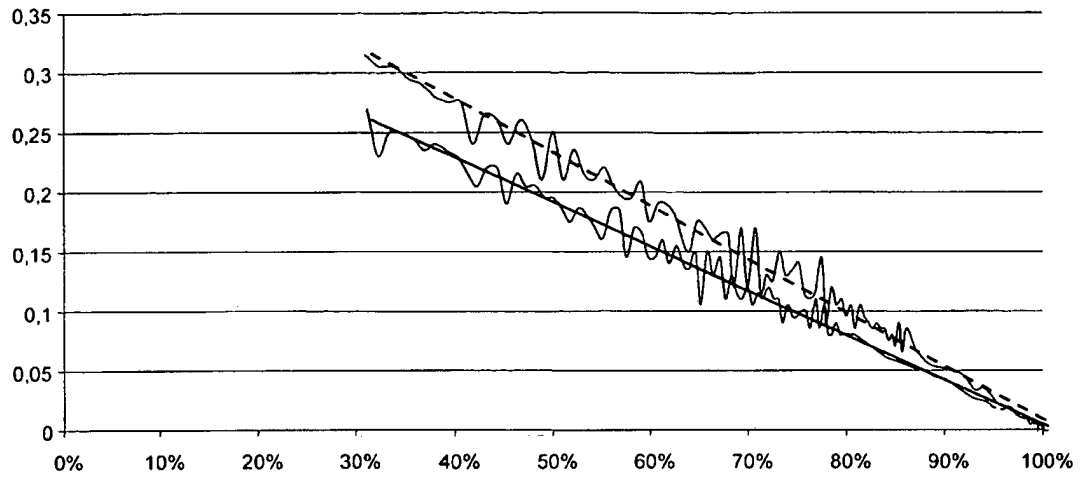


Fig. 2a

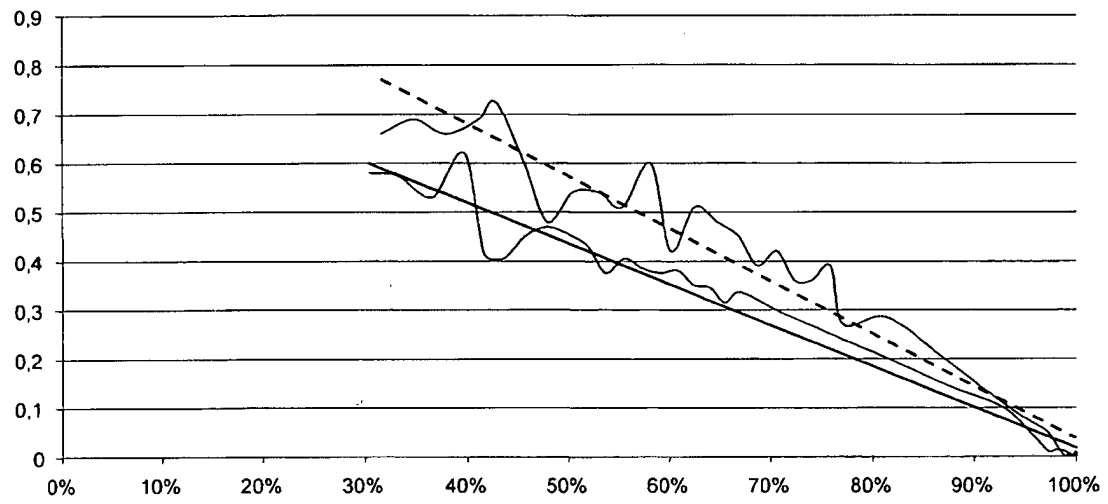


Fig. 2b