

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 271**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/08** (2006.01)

**C12N 15/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/JP2013/064995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13180208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13798125 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2857511**

54 Título: **Método de producción de proteína recombinante procedente de *Armoracia rusticana* usando hongos filamentosos**

30 Prioridad:

**31.05.2012 JP 2012124598**

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

**19.09.2018**

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)  
4-16, Kyobashi 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP**

72 Inventor/es:

**YOKOYAMA, FUMIKAZU;  
OKAKURA, KAORU;  
INOUE, ATSUSHI;  
MURASHIMA, KOICHIRO;  
NAGASATO, TOSHIAKI;  
YANAI, KOJI y  
NAKANE, AKITAKA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 682 271 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

Método de producción de proteína recombinante procedente de *Armoracia rusticana* usando hongos filamentosos

## 5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un método para producir una proteína recombinante de peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) usando un hongo filamentosos. Específicamente, la presente invención se refiere a un polinucleótido capaz de codificar un polipéptido de peroxidasa procedente de un rábano picante y que expresa el polipéptido en un hongo filamentosos, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, un transformante de un hongo filamentosos transformado con el vector de expresión introducido y un método para producir una proteína recombinante de peroxidasa de rábano picante usando el transformante.

## 15 [Antecedentes de la técnica]

La peroxidasa de rábano picante se usa ampliamente como una de las enzimas para la detección en diversas pruebas tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el método inmunohistoestático, el método de transferencia de Southern y el método de transferencia de Western. Además, la peroxidasa también se ha usado ampliamente como enzima para kits de inspección clínica recientemente.

En general, las peroxidases están ampliamente presentes en el reino vegetal tales como rábano blanco (*Raphanus sativus*), batata (*Ipomoea batatas*), trigo (*Triticum spp.*), rábano picante japonés (*Eutrema japonica*) y rábano picante. Debido a que el contenido de peroxidasa en el rábano picante es alto, u otras razones, el rábano picante se usa preferentemente en producciones industriales.

Sin embargo, la peroxidasa de rábano picante incluye enzimas múltiples tales como isozimas ácidas, neutras y básicas. Además, el contenido de peroxidasa y la relación de composición de estas isoenzimas varían mucho dependiendo de: las propiedades del suelo donde se cultiva el rábano picante, el tipo y la cantidad de fertilizante añadido, el clima, el tiempo de cosecha, etc. Además, en un método para producir una peroxidasa, se destruye una planta y la peroxidasa se purifica a partir de una gran diversidad de contaminantes. De lo anterior, la calidad de una peroxidasa purificada a partir de un rábano picante no es siempre la misma. En otras palabras, la mayoría de los productos de peroxidasa de rábano picante usados ampliamente en la actualidad son mezclas de un gran número de isoenzimas. En la mayoría de los casos, la relación es diferente de un lote a otro. Cuando dicho producto de peroxidasa de rábano picante se usa para realizar diversas mediciones, por ejemplo, ELISA, se produce un grave problema por la dificultad de obtener resultados de medición estables debido a que los resultados varían entre los lotes de producción.

Además, el rábano picante que sirve como materia prima requiere un largo período de cultivo y, en consecuencia, tiene un rendimiento que varía dependiendo del clima. Además, recientemente, ha crecido la preocupación sobre una situación en la que el suministro de rábano picante podría quedarse corto por razones de: baja eficiencia en el cultivo, agricultura alternativa a los cereales para el bioetanol que tiene una mayor demanda, y similares. Por lo tanto, existe una gran necesidad potencial de peroxidases de rábano picante que se puedan suministrar de forma continua.

Un método concebible para superar los problemas anteriormente mencionados de la peroxidasa de rábano picante es la producción en masa por microorganismos usando técnicas de recombinación genética. El uso de microorganismos no solo permite el cultivo en masa en un período corto, sino que también permite un suministro continuo sin influencia del clima. Además, el uso de técnicas de recombinación genética permite una única expresión de una peroxidasa diana en una gran cantidad. Esto permite evitar un problema de contaminación por isozimas.

Se han revelado la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa C1a, una de las principales isoenzimas de la peroxidasa de rábano picante, (véase NPL 1). Además, usando un gen que codifica la peroxidasa C1a, se ha estudiado la expresión en células vegetales de *Escherichia coli*, levadura y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Sin embargo, la cantidad de expresión es tan pequeña como 0,11 mg/l en *Escherichia coli*, (véase NPL 2), 5. 3 mg/l en levaduras (véase NPL 3) y 3 mg/l en células de plantas de tabaco (véase NPL 4). La productividad es bastante baja y poco práctica. A partir de lo anterior, se ha deseado desarrollar un organismo recombinante capaz de producir en masa peroxidasa de rábano picante, y un método para producir peroxidasa de rábano picante usando el organismo recombinante.

El documento WO\_01/72999 A1 divulga un método para mejorar la expresión de secuencias de polinucleótidos y polipéptidos evolucionados que codifican una peroxidasa de rábano picante en sistemas de expresión tales como *Escherichia coli* o levadura. El documento WO 2006/077258 A1 divulga una secuencia de nucleótidos que comprende un nucleótido sinónimo que codifica la secuencia con una frecuencia de codones optimizada de modo que un codon nativo se intercambie por un codón sinónimo, útil para producir una enzima, como la peroxidasa, en células huésped de hongos filamentosos optimizadas con codones como especies de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Chrysosporum* o *Penicillium*.

[Lista de citas]

[Bibliografía no de patente]

- 5 [NPL 1] Fujiyama et al., Eur. J. Biochem, 1988, vol. 173, págs. 681 a 687  
 [NPL 2] Lin et al., Biotechnol. Prog., 1999, vol. 15, pág 467 a 471  
 [NPL 3] Morawski et al., Protein Engineering, 2000, vol. 13, págs 377 a 384  
 [NPL 4] Matsui et al., J. Biosci. Bioeng., 2006, vol. 102, págs 102 a 109

## 10 [Sumario de la invención]

[Problema técnico]

- 15 La presente invención se ha realizado teniendo en cuenta los problemas descritos anteriormente en las técnicas convencionales. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que permita la producción en masa eficiente de un polipéptido de peroxidasa de rábano picante.

[Solución al Problema]

- 20 Con el fin de conseguir el objetivo anterior, los presentes inventores, en primer lugar, introdujeron en un hongo filamentoso un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la peroxidasa de rábano picante (HRP) C1a de tipo silvestre, y examinaron la cantidad del péptido HRP producido en el transformante obtenido. Sin embargo, los inventores no observaron ninguna producción del péptido HRP del transformante, y revelaron que incluso si se usa el polinucleótido que codifica el polipéptido HRP de tipo silvestre, no se producía ningún polipéptido HRP en el hongo filamentoso.

- 30 Por lo tanto, los presentes inventores han estudiado seriamente con el fin de expresar el polipéptido HRP en un hongo filamentoso a un alto nivel. En primer lugar, los inventores tomaron en consideración las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*. A continuación, los inventores prepararon un polinucleótido de HRP modificado con codón de modo que las frecuencias de aparición de codones en un polinucleótido de HRP se adaptaran para las frecuencias de uso de codones obtenidas. A continuación, *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma* se transformaron usando este polinucleótido de HRP modificado con codón. Como resultado, aunque no se observó ninguna expresión en *Humicola*, se observó la expresión de HRP en *Aspergillus* y *Trichoderma*. En particular, cuando se usó *Trichoderma*, se produjo con éxito HRP en una concentración de 100 veces o más en comparación con el pasado.

- 40 Por consiguiente, con el fin de expresar HRP en *Trichoderma* a un alto nivel, los presentes inventores transformaron *Trichoderma* usando un polinucleótido de HRP adaptado solo para las frecuencias de uso de codones de *Trichoderma*. Como resultado, se observó la expresión de HRP en el transformante. Sin embargo, sorprendentemente contra las expectativas, la productividad de HRP fue significativamente mayor en el caso de la transformación usando el polinucleótido modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma* que en el caso de la transformación usando el polinucleótido adaptado para las frecuencias de uso del codón de solo *Trichoderma* que sirvieron como las células huésped.

- 45 Con el fin de verificar aún más la efectividad de tomar en consideración las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, los presentes inventores prepararon un polinucleótido diferente que se modificó teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos, y *Trichoderma* transformado usando el polinucleótido para evaluar la expresión de HRP. Como resultado, se observó un alto nivel de expresión de HRP en *Trichoderma* transformado, de forma similar a lo anterior. Además, se reveló que la utilización de dicho polinucleótido de HRP modificado con codón también permitía una expresión de un polipéptido HRP en el hongo filamentoso, fusionándose el polipéptido HRP con un polipéptido etiqueta His o un polipéptido CBH1 procedente de *Trichoderma*.

- 55 Además, también se descubrió que estos polipéptidos fusionados con HRP permiten facilitar el aislamiento y la purificación de HRP. Además, se descubrió que un polipéptido de HRP producido por el hongo filamentoso transformado con el polinucleótido de HRP modificado con codón era capaz de decolorar un pigmento de achiote en presencia de peróxido de hidrógeno. Estos descubrimientos han llevado a la finalización de la presente invención. Específicamente, la presente invención proporciona más específicamente lo siguiente.

- 60 (1) Un polinucleótido modificado para tener al menos 200 codones cuya secuencia de bases es diferente de una secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante C1a, que tiene frecuencias de uso de codones en los siguientes porcentajes, y que es capaz de expresar el polipéptido que va a codificarse en un hongo filamentoso, en el que  
 65 en un caso en el que un aminoácido codificado por el codón modificado es alanina, una frecuencia de uso de GCC es de 77,5 % a 82,5 % y una frecuencia de uso de GCT es de 17,5 % a 22,5 %;

- en un caso en el que un aminoácido codificado por el codón modificado es arginina, una frecuencia de uso de CGC es de 87,5 % a 92,5 % y una frecuencia de uso de CGT es de 7,5 % a 12,5 %;
- 5 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido aspártico, una frecuencia de uso de GAC de 92,5 % a 97,5% y una frecuencia de uso de GAT es de 2,5 % a 7,5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es cisteína, una frecuencia de uso de TGC es del 100 %;
- 10 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glutamina, una frecuencia de uso de CAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido glutámico, una frecuencia de uso de GAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glicina, una frecuencia de uso de GGC de 72,5 % a 77,5 % y una frecuencia de uso de GGT es de 22,5 % a 27,5 %;
- 15 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es histidina, una frecuencia de uso de CAC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es isoleucina, una frecuencia de uso de ATC es del 100 %;
- 20 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es leucina, una frecuencia de uso de CTC es de 77,5 % a 82,5 % y una frecuencia de uso de CTG es de 17,51 % a 22,5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es lisina, una frecuencia de uso de AAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es fenilalanina, una frecuencia de uso de TTC es del 100 %;
- 25 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es prolina, una frecuencia de uso de CCC es de 77,5 % a 82,5 % y una frecuencia de uso de CCT es de 17,5 % a 22,5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es serina, una frecuencia de uso de AGC es de 12,5 % a 17,5 % y una frecuencia de uso de TCC es de 82,5 % a 87,5 %;
- 30 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es treonina, una frecuencia de uso de ACC es de 82,5 % a 87,5 % y una frecuencia de uso de ACG es de 12,5 % a 17,5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es tirosina, una frecuencia de uso de TAC es del 100 %; y
- 35 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es valina, una frecuencia de uso de GTC es de 82,5% a 87,5 %, una frecuencia de uso de GTG es de 2,5 % a 7,5 % y una frecuencia de uso de GTT es de 7,5 % a 12,5 %;
- la secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante es la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3, y
- el número de aminoácidos con las frecuencias de uso de codones en los porcentajes mencionados anteriormente son los 18 aminoácidos mencionados anteriormente.
- 40 (2) El polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), que codifica un polipéptido de la peroxidasa de rábano picante C1a y tiene al menos una característica seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (i) y (ii):
- 45 (i) que comprende una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 1; y
- (ii) que tiene una homología de 95 % o más con una secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 1.
- (3) El polinucleótido de acuerdo con (1), que codifica un polipéptido de la peroxidasa de rábano picante C1a y tiene al menos una característica seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (i) y (ii):
- 50 (i) que comprende una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 26; y
- (ii) que tiene una homología de 95 % o más con una secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 26.
- 55 (4) Un polinucleótido que comprende el polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), al que se añade un polinucleótido que codifica un polipéptido deseado.
- (5) Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4).
- (6) Un transformante de un hongo filamentoso transformado con el vector de expresión de acuerdo con (5) introducido.
- 60 (7) El transformante de acuerdo con (6), en el que el hongo filamentoso es uno cualquiera de un hongo perteneciente al género *Trichoderma* y un hongo perteneciente al género *Aspergillus*.
- (8) El transformante de acuerdo con (6), en el que el hongo filamentoso es uno cualquiera de *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*.
- (9) El transformante de acuerdo con (6), en el que el hongo filamentoso es *Trichoderma viride*.
- 65 (10) Un método de producción de un polipéptido codificado por el polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (10), comprendiendo el método las etapas de:

cultivar el transformante de acuerdo con uno cualquiera de (6) a (9); y recoger el polipéptido expresado a partir del transformante cultivado y/o un cultivo del transformante.

### [Efectos ventajosos de la invención]

5 La presente invención proporciona un polinucleótido que codifica peroxidasa de rábano picante y que comprende codones optimizados para la expresión en un hongo filamentoso. Además, la presente invención permite producir una proteína recombinante de peroxidasa de rábano picante usando *Trichoderma viride* o *Aspergillus niger* transformado con el polinucleótido.

### [Breve descripción de las figuras]

15 [Fig. 1] La Fig. 1 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar un hongo filamentoso (*Trichoderma*) con un vector de expresión (pCB1-HRP nativo) que comprende un polinucleótido que codifica la peroxidasa de rábano picante (HRP) C1a de tipo silvestre, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante por transferencia Western usando un anticuerpo anti-HRP. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

20 [Fig. 2] La Fig. 2 es una figura para ilustrar el resultado de comparar la secuencia de bases (posiciones 1 a 540) entre un polinucleótido de HRP de tipo silvestre y un polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con codón) de la presente invención. En la figura, las secuencias superiores muestran la secuencia de bases del polinucleótido de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3), y las secuencias inferiores muestran la del polinucleótido de la presente invención (secuencia de bases de SEQ ID NO: 1).

25 [Fig. 3] La Fig. 3 es una figura para ilustrar el resultado de comparar la secuencia de bases (posiciones 541 a 1014) entre el polinucleótido de HRP de tipo silvestre y el polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con codón) de la presente invención. En la figura, las secuencias superiores muestran la secuencia de bases del polinucleótido de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3), y las secuencias inferiores muestran la del polinucleótido de la presente invención (secuencia de bases de SEQ ID NO: 1).

30 [Fig. 4] La Fig. 4 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Humicola* con un vector de expresión (pNCE2-HRP-*humicola*) que comprende el polinucleótido de la presente invención, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-etiqueta His. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

35 [Fig. 5] La Fig. 5 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Aspergillus* con un vector de expresión (pAmyB-pyr-HRP-*aspergillus*) que comprende el polinucleótido de la presente invención, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-etiqueta His. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

40 [Fig. 6] La Fig. 6 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Trichoderma* con un vector de expresión (pCB1-HRP-*tricho*) que comprende el polinucleótido de la presente invención, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-etiqueta His. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

45 [Fig. 7] La Fig. 7 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Trichoderma* con un vector de expresión (pCB1-HRP(sin His)-*tricho*) que comprende el polinucleótido de la presente invención, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-HRP. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

50 [Fig. 8] La Fig. 8 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Trichoderma* con un vector de expresión (pCB1-KR-HRP-*tricho*) que comprende el polinucleótido de la presente invención, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-HRP. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

55 [Fig. 9] La Fig. 9 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Trichoderma* con un vector de expresión (pCB1-HRP(sin His)-*tricho* 2) que comprende un polinucleótido de HRP adaptado solo para frecuencias de uso de codones de *Trichoderma*, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-HRP. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

60 [Fig. 10] La Fig. 10 es una figura para ilustrar el resultado de comparar la secuencia de bases (posiciones 1 a 540) entre un polinucleótido de HRP de tipo silvestre y un polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con codón) de la presente invención. En la figura, las secuencias superiores muestran la secuencia de bases del polinucleótido de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3), y las secuencias inferiores muestran la del polinucleótido de la presente invención (secuencia de bases de SEQ ID NO: 26).

65 [Fig. 11] La Fig. 11 es una figura para ilustrar el resultado de comparar la secuencia de bases (posiciones 541 a 1014) entre el polinucleótido de HRP de tipo silvestre y el polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con

codón) de la presente invención. En la figura, las secuencias superiores muestran la secuencia de bases del polinucleótido de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3), y las secuencias inferiores muestran la del polinucleótido de la presente invención (secuencia de bases de SEQ ID NO: 26).

[Fig. 12] La Fig. 12 es una figura para ilustrar el resultado de comparar la secuencia de bases (posiciones 1 a 540) entre los polinucleótidos de la presente invención. En la figura, las secuencias superiores muestran la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y las secuencias inferiores muestran la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26.

[Fig. 13] La Fig. 13 es una figura para ilustrar el resultado de comparar la secuencia de bases (posiciones 541 a 1017) entre los polinucleótidos de la presente invención. En la figura, las secuencias superiores muestran la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y las secuencias inferiores muestran la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26.

[Fig. 14] La Fig. 14 es una fotografía para ilustrar el resultado de transformar *Trichoderma* con un vector de expresión (pCB1-HRP(sin His)-*tricho* 3) que comprende el polinucleótido de la presente invención, y analizar un sobrenadante de cultivo del transformante resultante mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-HRP. En la figura, la calle 1 muestra el resultado de la dispersión de un marcador de peso molecular, y la calle 2 muestra el resultado de la dispersión del sobrenadante del cultivo del transformante.

### [Descripción de las realizaciones]

<Polinucleótido>

Como se describe en los ejemplos posteriores, en un análisis de transferencia Western, incluso si se usa un polinucleótido que tiene una secuencia de base de tipo silvestre que codifica un polipéptido peroxidasa de rábano picante (HRP), no se detectó ninguna expresión de un polipéptido HRP en un hongo filamentoso. Sin embargo, la expresión del polipéptido de HRP se detectó en el hongo filamentoso usando un polinucleótido modificado para tener un(os) codón(es) cuya secuencia de bases es diferente de la secuencia de bases de tipo silvestre.

Por tanto, de acuerdo con una realización, la presente invención proporciona el siguiente polinucleótido.

Un polinucleótido modificado para tener al menos 200 codones cuya secuencia de bases es diferente de una secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante C1a, que tiene frecuencias de uso de codones en los siguientes porcentajes, y que es capaz de expresar el polipéptido que va a codificarse en un hongo filamentoso, en el que

en un caso en el que un aminoácido codificado por el codón modificado es alanina, una frecuencia de uso de GCC es del 80 % y una frecuencia de uso de GCT es del 20 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es arginina, una frecuencia de uso de CGC es del 90 % y una frecuencia de uso de CGT es del 10 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es asparagina, una frecuencia de uso de AAC es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido aspártico, una frecuencia de uso de GAC es del 95 % y una frecuencia de uso de GAT es del 5 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es cisteína, una frecuencia de uso de TGC es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glutamina, una frecuencia de uso de CAG es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido glutámico, una frecuencia de uso de GAG es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glicina, una frecuencia de uso de GGC es del 75 % y una frecuencia de uso de GGT es del 25 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es histidina, una frecuencia de uso de CAC es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es isoleucina, una frecuencia de uso de ATC es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es leucina, una frecuencia de uso de CTC es del 80 % y una frecuencia de uso de CTG es del 20 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es lisina, una frecuencia de uso de AAG es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es fenilalanina, una frecuencia de uso de TTC es del 100 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es prolina, una frecuencia de uso de CCC es del 80 % y una frecuencia de uso de CCT es del 20 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es serina, una frecuencia de uso de AGC es del 15 % y una frecuencia de uso de TCC es del 85 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es treonina, una frecuencia de uso de ACC es del 85 % y una frecuencia de uso de ACG es del 15 %;

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es tirosina, una frecuencia de uso de TAC es

del 100 %; y

en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es valina, una frecuencia de uso de GTC es del 85 %, una frecuencia de uso de GTG es del 5 % y una frecuencia de uso de GTT es del 10 %.

L

- 5 El término polipéptido HRP significa una enzima extraída de rábano picante y que tiene una actividad de escisión oxidativa y que descompone una estructura de peróxido en dos grupos hidroxilo. Ejemplos del mismo incluyen isoenzimas HRP C1a, HRP C1b, HRP C1c, HRP C2 y HRP C3. Un polipéptido HRP C1a es una isozima que tiene el contenido más alto entre peroxidases de rábano picante, de modo que sus propiedades se reflejan más en las propiedades de una mezcla de peroxidases que se extrae de rábano picante y generalmente se usa como reactivo o similar.

Además, el polipéptido HRP C1a es normalmente un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Además, en la naturaleza también, una secuencia de aminoácidos puede experimentar una mutación. Por tanto, el polipéptido HRP incluye cualquier polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos, siempre que una proteína que tenga la actividad descrita anteriormente esté codificada.

Obsérvese que, en el polipéptido HRP C1a, se sabe que un polipéptido que comprende restos del resto de metionina en el extremo N al 30º resto de alanina funciona como un péptido señal de HRP. Además, en la presente invención, el término polipéptido significa una molécula que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante un(os) enlace(s) peptídico(s). Por tanto, el término es un concepto que incluye no solo proteínas de longitud completa, sino también los denominados oligopéptidos. Además de una mutación de la secuencia de aminoácidos, el polipéptido puede modificarse, por ejemplo, mediante glucosilación, fosforilación, palmitoilación, prenilación, metilación, acetilación, ubiquitinación, SUMOilación, hidroxilación, amidación y similares.

En la presente invención, la expresión "secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de HRP" es una secuencia de bases de SEQ ID NO: 3. El término "codón" significa una combinación de bases en tres nucleótidos que codifican un aminoácido.

En la presente invención, al menos un codón que tiene una secuencia de bases diferente de la secuencia de bases de tipo silvestre es preferentemente un codón para mejorar la eficiencia de traducción en un hongo filamentoso. Este codón es preferentemente un codón que tiene una "mutación de degeneración" introducida sin un cambio en la secuencia de aminoácidos.

Cuando la cantidad de un polipéptido de HRP producido introduciendo en un hongo filamentoso un polinucleótido modificado para tener al menos un codón cuya secuencia de bases es diferente de la secuencia de bases de tipo silvestre es mayor que la cantidad de un polipéptido de HRP producido introduciendo en un hongo filamentoso un polinucleótido que tiene la secuencia de base de tipo silvestre, el codón se puede determinar como el "codón para mejorar la eficiencia de traducción en un hongo filamentoso". Las cantidades de polipéptidos de HRP pueden compararse como se describe en los ejemplos posteriores, por ejemplo, empleando métodos conocidos tales como transferencia Western, detección del desarrollo de color con tetrametilbenzidina (medición de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm) y medición de la actividad de oxidación del guayacol.

Además, el número de codones modificados es al menos 200 y en particular preferentemente 200 o más (por ejemplo, 210 o más, 220 o más, 230 o más, 240 o más). Además, en la presente invención, la relación de los codones modificados a todos los codones en el polinucleótido que tiene la secuencia de bases de tipo silvestre es preferentemente al menos 10 %, más preferentemente del 30 % o más y en particular preferentemente 60 % o más (por ejemplo, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 100 %). Obsérvese que, entre 338 codones en una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 1, se modifican 246 codones (72,8 %) (se introduce la mutación de degeneración). Además, entre 338 codones en una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 26, se modifican 245 codones (72,5%) (se introduce la mutación de degeneración).

En la presente invención, el término hongo filamentoso significa un hongo compuesto de hifas. Ejemplos de hongo filamentoso incluyen hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, pertenecientes al género *Aspergillus*, pertenecientes al género *Acremonium*, pertenecientes al género *Fusarium*, pertenecientes al género *Myceliophthora*, pertenecientes al género *Neurospora*, pertenecientes al género *Penicillium*, pertenecientes al género *Rhizomucor*, pertenecientes al género *Thermonyces*, pertenecientes al género *Thielavia*, y pertenecientes al género *Tolyposcladium*.

Además, más específicamente, ejemplos de los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* incluyen *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, y *Trichoderma reesei*. Además, ejemplos de los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* incluyen *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, y *Aspergillus oryzae*. Entre estos, se prefieren los hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*, y se prefieren más *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*.

En la presente invención, la expresión "capaz de expresar el polipéptido que se va a codificar" en dicho hongo filamentoso significa que una concentración de HRP producida en un sobrenadante de cultivo es de 0,001 mg/l o más, preferentemente de 1 mg/l o más, más preferentemente 10 mg/l o más, aún más preferentemente 100 mg/l o más, y en particular preferentemente 300 mg/l o más, en la que el sobrenadante del cultivo se obtiene cultivando un hongo filamentoso transformado introduciendo en él el polinucleótido modificado para tener al menos un codón cuya secuencia de bases es diferente de la secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido HRP, y el sobrenadante del cultivo se diluye de tal manera que una concentración del transformante es de  $9 \times 10^8$  UFC/ml.

Como se describe en los ejemplos más posteriores, las frecuencias de uso de codones que se muestran en la Tabla 1 posterior se calcularon teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de tres especies en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*. A continuación, las frecuencias de aparición de codones en el polinucleótido de HRP de tipo silvestre se adaptaron para las frecuencias de uso de codones obtenidas. La secuencia de bases del polinucleótido de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3) se alteró a la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26. Posteriormente, el polinucleótido de HRP modificado con codón así preparado se usó para transformar un hongo filamentoso. Como resultado, se detectó una expresión de un polipéptido de HRP a pesar de que no se observó ninguna expresión del polipéptido de HRP usando el polinucleótido de HRP de tipo silvestre.

Por tanto, un polinucleótido de la presente invención es un polinucleótido que codifica un polipéptido HRP y se modifica para tener frecuencias de uso de codones en los siguientes porcentajes, en el que

- en un caso en el que un aminoácido codificado por el codón modificado es alanina, una frecuencia de uso de GCC es del 80 % y una frecuencia de uso de GCT es del 20 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es arginina, una frecuencia de uso de CGC es del 90 % y una frecuencia de uso de CGT es del 10 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es asparagina, una frecuencia de uso de AAC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido aspártico, una frecuencia de uso de GAC es del 95 % y una frecuencia de uso de GAT es del 5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es cisteína, una frecuencia de uso de TGC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glutamina, una frecuencia de uso de CAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido glutámico, una frecuencia de uso de GAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glicina, una frecuencia de uso de GGC es del 75 % y una frecuencia de uso de GGT es del 25 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es histidina, una frecuencia de uso de CAC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es isoleucina, una frecuencia de uso de ATC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es leucina, una frecuencia de uso de CTC es del 80 % y una frecuencia de uso de CTG es del 20 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es lisina, una frecuencia de uso de AAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es fenilalanina, una frecuencia de uso de TTC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es prolina, una frecuencia de uso de CCC es del 80 % y una frecuencia de uso de CCT es del 20 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es serina, una frecuencia de uso de AGC es del 15 % y una frecuencia de uso de TCC es del 85 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es treonina, una frecuencia de uso de ACC es del 85 % y una frecuencia de uso de ACG es del 15 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es tirosina, una frecuencia de uso de TAC es del 100 %; y en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es valina, una frecuencia de uso de GTC es del 85 %, una frecuencia de uso de GTG es del 5 % y una frecuencia de uso de GTT es del 10 %.

En la presente invención, expresiones tales como "la secuencia de bases de HRP de tipo silvestre se modifica para tener las frecuencias de uso de codones en los porcentajes anteriores" significa incluir no solo que las frecuencias de uso de codones coinciden con los valores de los porcentajes anteriores *en sí*, sino también que las frecuencias de uso del codón están adaptadas dentro de un intervalo del 2,5 % de los valores de los porcentajes. Por ejemplo, en el caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado sea serina, la expresión significa que, en la secuencia de bases del polinucleótido que codifica un polipéptido HRP, se altera el codón que codifica la serina para tener frecuencias de uso adaptadas tales que la frecuencia de uso de AGC es de 12,5 a 17,5 %, y la frecuencia de uso de TCC es de 82,5 a 87,5 %. Sin embargo, en el polinucleótido de la presente invención, el número de aminoácidos con las frecuencias de uso de codón en los porcentajes mencionados anteriormente son los 18 aminoácidos mencionados anteriormente.

Tal como se ha descrito anteriormente, como resultado de transformar un hongo filamentoso usando el polinucleótido que tiene la secuencia de bases modificada para tener las frecuencias de uso de codones en los porcentajes anteriores (la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26), se detectó una expresión de un polipéptido de HRP a un nivel significativamente alto.

5 Por tanto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante (HRP) C1a y tiene al menos una característica seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (i) y (ii):

- 10 (i) que comprende una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 1; y  
 (ii) que tiene una homología de 95 % o más con una secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 1.

15 Además, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante (HRP) C1a y tiene al menos una característica seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (i) y (ii):

- 20 (i) que comprende una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 26; y  
 (ii) que tiene una homología de 95 % o más con una secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 26.

25 En la presente invención, la "secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 1" y la "secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 26" significan cada una específicamente una secuencia de bases modificada para tener las frecuencias de uso de codones en los porcentajes anteriores y codificar adicionalmente el polipéptido HRP C1a, a partir del cual se excluye una secuencia de bases que codifica una secuencia señal.

30 Además, el término "homología" con respecto a la secuencia de bases se usa como un significado del grado de correspondencia, entre secuencias que se van a comparar, en bases que constituyen cada secuencia. Cada uno de los valores numéricos de "homología" descritos en la presente descripción puede ser cualquier valor numérico calculado usando un programa de búsqueda de homología conocido por los expertos en la técnica, y puede calcularse fácilmente usando los parámetros predeterminados (ajuste inicial) en FASTA, BLAST, Smith-Waterman, etc., por ejemplo.

35 Además, con el fin de que el polipéptido HRP C1a demuestre su actividad, no se requiere ninguna secuencia señal. Por consiguiente, en el polinucleótido de la presente invención, un polinucleótido que codifica la secuencia señal (secuencia de bases correspondiente a las posiciones 1 a 90 de SEQ ID NO: 1) se puede excluir del polinucleótido de HRP.

40 Los expertos en la técnica pueden preparar el polinucleótido de la presente invención empleando técnicas conocidas según sea adecuado. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos posteriores, el polinucleótido de la presente invención se puede sintetizar químicamente usando un sintetizador de ADN disponible en el mercado sobre la base de información sobre una secuencia de bases diseñada para tener una secuencia de bases diferente en al menos un codón de la secuencia de bases tipo silvestre que codifica un polipéptido de HRP. Como alternativa, el polinucleótido de la presente invención puede prepararse por métodos bien conocidos tales como mutagénesis dirigida al sitio para introducir una mutación (sustitución de bases) en el polinucleótido de HRP de tipo silvestre.

45 Como se describe en los ejemplos posteriores, también se ha revelado que la utilización del polinucleótido de HRP modificado con codón permite expresar en un hongo filamentoso un polipéptido HRP fusionado con un polipéptido etiqueta His o un polipéptido CBH1 (celobiohidrolasa 1) procedente de *Trichoderma*.

50 Por tanto, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende el polinucleótido de HRP modificado con codón al que se añade adicionalmente un polinucleótido que codifica un polipéptido deseado.

55 En la presente invención, el polipéptido deseado no está particularmente limitado. Si el polipéptido HRP se añade como una etiqueta para detección, por ejemplo, el polipéptido deseado puede detectarse fácilmente.

60 Por otro lado, en la presente invención, el polipéptido deseado puede añadirse al polipéptido HRP para purificar el polipéptido HRP. Un ejemplo de dicho polipéptido usado para purificar el polipéptido de HRP incluye un polipéptido que tiene una capacidad de adsorción de sustrato. Más específicamente, los ejemplos incluyen celobiohidrolasa (CBH), endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, glucoamilasa, albúmina, anticuerpos, anticuerpos Fab, anticuerpos scFV, una etiqueta His, una etiqueta GST, una etiqueta MBP, una etiqueta TAP, una etiqueta FLAG, etiqueta Myc, una etiqueta HA, una etiqueta V5 y una etiqueta T7.

65 El polinucleótido de HRP modificado con codón y el polinucleótido que codifica el polipéptido deseado pueden añadirse de cualquier modo, siempre que se traduzca una cadena única de un polipéptido de fusión sin cambiar los marcos de lectura de estos polipéptidos mediante la adición. El polinucleótido que codifica el polipéptido deseado se

puede añadir a uno o ambos lados del lado 5' y el lado 3' del polinucleótido de HRP modificado con el codón. Además, dicha adición puede ser directa o indirecta. Un ejemplo de la adición indirecta incluye un modo en el que se inserta un polinucleótido que codifica un polipéptido enlazador entre el polinucleótido de HRP modificado con codón y el polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. La longitud de dicho polipéptido enlazador es normalmente de 1 a 100 aminoácidos, preferentemente, de 1 a 50 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 30 aminoácidos y en particular preferentemente de 12 a 18 aminoácidos (por ejemplo, 15 aminoácidos).

< Vector de expresión, transformante >

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la presente invención. El vector de expresión de la presente invención se puede construir sobre la base de un vector autoreplicante, es decir, por ejemplo, un plásmido que existe como un elemento extracromosómico, y que se replica independientemente de la replicación del cromosoma. Como alternativa, el vector de expresión de la presente invención se puede replicar junto con el cromosoma de un hongo filamentoso huésped, después de introducirlo en el hongo filamentoso e incorporarlo al genoma del mismo.

Con el fin de expresar la HRP y similares después de la introducción en un hongo filamentoso, el vector de expresión de la presente invención comprende deseablemente, además del polinucleótido de la presente invención, un polinucleótido para regular la expresión, un marcador genético para seleccionar el transformante y similares.

Ejemplos de dicho polinucleótido para regular la expresión incluyen un promotor, una secuencia líder, un terminador y similares. El promotor no está particularmente limitado, siempre que la actividad transcripcional se muestre en el hongo filamentoso. El promotor puede obtenerse como un polinucleótido para regular una expresión de un gen que codifica cualquier polipéptido de la misma especie o género que el de un hongo filamentoso huésped o cualquier polipéptido de diferentes especies o géneros. Ejemplos de dicho promotor incluyen promotores de un gen de  $\alpha$ -amilasa, un gen de glucoamilasa, un gen de celobiohidrolasa o un gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. El terminador debe ser una secuencia reconocida por un hongo filamentoso para terminar la transcripción. Ejemplos de los mismos incluyen terminadores de TAKA amilasa, una glucoamilasa, un gen de celobiohidrolasa, una antranilato sintasa,  $\alpha$ -glucosidasa, un gen trpC o un gen de proteasa de tipo tripsina. La secuencia líder debe ser una región no traducida de un ARNm de modo que se pueda mejorar la eficiencia de la traducción por un hongo filamentoso. Ejemplos de los mismos incluyen secuencias líder de TAKA amilasa, fosfotriosa isomerasa o un gen glaA.

Además, el marcador genético para seleccionar el transformante puede seleccionarse según sea adecuado de acuerdo con el método para seleccionar el transformante. Por ejemplo, se puede usar un gen que codifica resistencia a fármacos y un gen que complementa la auxotrofia. Ejemplos del marcador genético incluyen un gen de biosíntesis de uracilo (pyr4), un gen de asimilación de nitrato (niaD), un gen de biosíntesis de arginina (argB), un gen de acetamidasa (amdS), un gen de ornitina carbamoiltransferasa (argB), un gen de fosfinotricinacetil transferasa (bar), un gen de unión a bleomicina (bleA), un gen de higromicina fosfotransferasa (hygB), un gen de orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (pyrG), un gen de sulfato de adenil transferasa (sC), un gen de antranilato sintasa (trpC), un gen de resistencia a la destomicina, un gen de resistencia a la higromicina, un gen de resistencia a bialafos, un gen de resistencia a la bleomicina y un gen de resistencia a la aureobasidina.

Los expertos en la técnica pueden diseñar y preparar dicho vector según sea adecuado empleando técnicas de recombinación genética conocidas y similares.

Además, se puede producir un polipéptido de HRP y similares en un hongo filamentoso introduciendo dicho vector de la presente invención en el mismo. Por tanto, la presente invención proporciona un transformante de un hongo filamentoso transformado con el vector de expresión introducido.

Ejemplos del hongo filamentoso son como se describió anteriormente. Sin embargo, desde el punto de vista de que un polipéptido HRP y similares se producen en mayores cantidades, se prefieren los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* (particularmente, *Trichoderma viride*) y hongos pertenecientes al género *Aspergillus* (particularmente, *Aspergillus niger*), más preferentemente hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, y en particular preferentemente *Trichoderma viride*.

El método para introducir el vector de la presente invención no está particularmente limitado, y se pueden emplear métodos conocidos. Ejemplos de dichos métodos conocidos incluyen un método de protoplastos, un método de cloruro de calcio, un método de electroporación, un método competente, un método de choque térmico, un método de esferoplastos y un método de acetato de litio. Además, como se describe en los ejemplos posteriores, se puede emplear un método denominado de cotransformación, en el que el vector de expresión que comprende el polinucleótido de la presente invención y un vector que comprende el marcador genético se introducen al mismo tiempo.

65

<Método de producción de polipéptido HRP y similares, polipéptido HRP y similares, Preparación que comprende polipéptido HRP y similares>

5 La presente invención permite producir un polipéptido codificado por el polinucleótido de la presente invención, comprendiendo la producción:

10 cultivar el transformante; y  
recoger el polipéptido HRP y similares expresado a partir del transformante cultivado y/o un cultivo del transformante. En la presente invención, el transformante se puede cultivar seleccionando el medio, la condición de cultivo y similares según sea adecuado de acuerdo con un método convencional.

15 En la presente invención, el "cultivo" se refiere a un medio obtenido cultivando el transformante en un medio adecuado para un hongo filamentoso, el medio que contiene el transformante proliferado, una secreción y un metabolito del transformante, y similares. El cultivo también incluye una dilución y un concentrado de estos.

20 Solo es necesario que los medios contengan lo que un hongo filamentoso puede asimilar. Ejemplos de los mismos incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de azufre, minerales, metales, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, hidrolizado de caseína, suero y similares. Además, a dicho medio, es posible añadir, por ejemplo, un antibiótico correspondiente a un gen de resistencia a fármaco que el vector de expresión de la presente invención puede codificar, o un nutriente correspondiente al gen que complementa la auxotrofia que el vector de expresión de la presente invención puede codificar.

25 La condición de cultivo de acuerdo con la presente invención debe ser una condición bajo la cual el transformante de la presente invención pueda secretar y producir un polipéptido de HRP y similares en el medio descrito anteriormente. Los expertos en la técnica pueden ajustar y establecer la temperatura, ya sea para añadir aire o no, la concentración de oxígeno, la concentración de dióxido de carbono, el pH del medio, la temperatura de cultivo, el período de cultivo, la humedad, etc. según sea adecuado de acuerdo con el tipo de hongo filamentoso, el medio usado y similares.

30 Además, un ejemplo del método de recogida del polipéptido HRP y similares expresado a partir del transformante cultivado incluye un método en el que: el transformante se recoge (por filtración, centrifugación o similar), se extrae el polipéptido HRP y similares (por tratamiento de molienda, trituración por presurización, o similares) del transformante recogido, y se purifica adicionalmente (por un método de precipitación por adición de sal, un método de precipitación con disolvente, o similares).

35 Además, los ejemplos del método para recoger el polipéptido HRP y similares expresado a partir del transformante incluyen un método en el que el hongo filamentoso se extrae con un filtro de cultivo (por ejemplo, un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  o menos), y métodos conocidos tales como filtración de extracción, centrifugación, diálisis, concentración, secado, congelación, adsorción, desadsorción, métodos que utilizan una diferencia de solubilidad de diversas soluciones (por ejemplo, precipitación, precipitación de proteínas, cristalización, recristalización, disolución de transferencia, cromatografías). Además, estos métodos se pueden emplear solos, o se pueden emplear en combinación en cualquier orden o repetidamente.

45 Sin embargo, en el caso en el que el polipéptido codificado por el polinucleótido de la presente invención comprenda una etiqueta para purificar HRP como se describió anteriormente, la purificación puede realizarse usando un sustrato al que se adsorbe la etiqueta.

50 Mediante dicho método de producción, se puede obtener el polipéptido HRP, el polipéptido HRP que no contiene ninguna secuencia señal, o estos polipéptidos a los que se añade el polipéptido deseado. Por tanto, la presente invención proporciona estos polipéptidos de HRP y similares.

55 Sin embargo, dado que un polipéptido HRP C1a extraído de rábano picante tiene una cadena de carbohidratos de aproximadamente 10 kDa añadida al mismo, dicho polipéptido HRP C1a se detecta como un polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa en un análisis por SDS-PAGE o similar. Por otro lado, como se describe en los ejemplos posteriores, un polipéptido HRP C1a obtenido mediante el método de producción de la presente invención se detecta como un polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 32 kDa en un análisis por SDS-PAGE o similar. Además, aunque no se describe en los ejemplos posteriores, los presentes inventores han descubierto que una cadena de carbohidratos de un polipéptido HRP C1a extraído de rábano picante no se escinde por la glucosidasa F; sin embargo, una cadena de carbohidratos de un polipéptido HRP C1a obtenido mediante el método de producción de la presente invención se escinde mediante la enzima. Estos hallazgos han revelado que se añade un resto del núcleo de la fucosa de unión  $\alpha 1,3$  a una cadena de carbohidratos de un polipéptido HRP C1a extraído de rábano picante, pero no se añade ningún resto de núcleo de fucosa de unión  $\alpha 1,3$  a una cadena de carbohidratos de un polipéptido HRP C1a obtenido mediante el método de producción de la presente invención.

65 Por tanto, el polipéptido de HRP y similares obtenidos mediante el método de producción de la presente invención

tienen una modificación de la cadena de carbohidratos diferente de la de un polipéptido de HRP producido con rábano picante. Por consiguiente, el polipéptido puede ser un polipéptido

5 producido mediante el método de producción de la presente invención y que tiene una cadena de carbohidratos eliminada del mismo. La cadena de carbohidratos se puede eliminar usando una enzima capaz de descomponer y eliminar una cadena de carbohidratos. Ejemplos de dicha enzima incluyen glucosidasa F (glucopeptidasa F) y endoglucosidasa H.

10 Además, también se divulga en el presente documento una preparación que comprende un polipéptido de HRP y similares producido mediante el método de producción. La preparación debe comprender el polipéptido HRP y similares producido mediante el método de producción, pero puede comprender otros ingredientes aceptables como una preparación del polipéptido HRP y similares, además del polipéptido HRP y similares. Ejemplos de dichos ingredientes adicionales incluyen un vehículo, un excipiente, un desintegrador, un tampón, un emulsionante, una suspensión, un estabilizante, un conservante, un antiséptico y una sal fisiológica. Como excipiente, se puede usar lactosa, almidón, sorbitol, D-manitol, azúcar blanco o similares. Como desintegrador, se puede usar almidón, carboximetilcelulosa, carbonato de calcio o similares. Como tampón, se puede usar un fosfato, un citrato, un acetato o similares. Como emulsionante, se puede usar goma arábica, alginato de sodio, tragacanto o similares. Como suspensión, se puede usar monoestearato de glicerilo, monoestearato de aluminio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, lauril sulfato de sodio o similares. Como estabilizador, se puede usar propilenglicol, sulfito de dietilina, ácido ascórbico o similares. Como conservante, se puede usar fenol, cloruro de benzalconio, alcohol bencílico, clorobutanol, metilparabeno o similares. Como antiséptico, se puede usar azida de sodio, cloruro de benzalconio, ácido para-hidroxibenzoico, clorobutanol o similares.

25 <Uso de polipéptido HRP y similares>

Se sabe que un polipéptido de HRP que actúa como catalizador oxida sustratos luminiscentes y cromogénicos tales como luminol o TMB (tetrametilbenzidina), causando la quimioluminiscencia y el desarrollo de color. Además, la unión de un polipéptido de HRP a una molécula diana permite la detección de la molécula diana sobre la base de la quimioluminiscencia anterior y similares. Por tanto, se divulga en el presente documento un método para detectar una molécula diana, comprendiendo el método la unión de la molécula diana a un polipéptido (el polipéptido de la presente invención) producido mediante el método de producción de la presente invención.

35 La molécula diana detectada por el método no está particularmente limitada. Ejemplos de los mismos incluyen polipéptidos, ácidos nucleicos, azúcares y lípidos.

En el método para detectar una molécula diana, el polipéptido de la presente invención se une a una molécula diana. Por consiguiente, se prefiere que se añada una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) capaz de unirse específicamente a la molécula diana al polipéptido. Además, también se prefiere usar el polipéptido descrito anteriormente al que se añade una molécula (denominada segundo anticuerpo, proteína A o proteína G que reconoce un anticuerpo que es la molécula de interés en el caso) capaz de unirse específicamente a la molécula de interés.

45 Dicha adición no está particularmente limitada, y puede ser una adición a nivel genético, o puede ser una adición química. La adición a un nivel genético se realiza usando un polinucleótido de HRP modificado con codón al que se añade un polinucleótido que codifica el anticuerpo o similar como el polinucleótido de la presente invención como se describió anteriormente. Además, la adición química puede ser un enlace covalente, o puede ser un enlace no covalente. El "enlace covalente" no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen un enlace amida entre un grupo amino y un grupo carboxilo, un enlace alquilamina entre un grupo amino y un grupo haluro de alquilo, un enlace disulfuro entre tioles y un enlace tioéster entre un grupo tiol y un grupo maleimida o un grupo haluro de alquilo. Un ejemplo del "enlace no covalente" incluye una unión entre biotina y avidina.

Ejemplos de los sustratos luminiscentes y cromogénicos usados en el método para detectar una molécula diana incluyen luminol, TMB, pirogalol, guayacol y dianisidina.

55 Además, como se describe en los ejemplos posteriores, el polipéptido es capaz de decolorar un pigmento tal como achiote en presencia de peróxido de hidrógeno. Por tanto, se divulga en el presente documento un método para decolorar un pigmento, comprendiendo el método causar que un polipéptido producido mediante el método de la presente invención actúe sobre el pigmento en presencia de peróxido de hidrógeno.

60 Ejemplos del pigmento decolorado por el método descrito anteriormente incluyen achiote, naranja II, rojo de alizarina S, tropaolina O y chalcona. Además, los expertos en la técnica pueden establecer condiciones de reacción en dicha decoloración de pigmento, es decir, la concentración y la temperatura del peróxido de hidrógeno, el tipo y el pH de un sistema (por ejemplo, un tampón) en el que el polipéptido HRP y el pigmento se mezclan entre sí, y así sucesivamente, según sea adecuado de acuerdo con el tipo y similares del pigmento sometido a la decoloración.

65 Además, un polipéptido de HRP que actúa como catalizador oxida un resto de fenol en un compuesto fenólico a un

radical fenoxi. El radical fenoxi forma luego un multímero insoluble en agua por polimerización por sí mismo. Además, se sabe que el multímero puede eliminarse fácilmente como un precipitado.

5 Por tanto, también se divulga en el presente documento un método para eliminar un compuesto fenólico, comprendiendo el método causar que un polipéptido producido mediante el método de la presente invención actúe sobre el compuesto fenólico en presencia de peróxido de hidrógeno.

10 El compuesto fenólico eliminado mediante el método descrito anteriormente no está particularmente limitado, siempre que el compuesto tenga un resto fenol que va a ser oxidado por una peroxidasa como se describió anteriormente. Ejemplos del compuesto fenólico incluyen p-cresol, p-etil fenol y pn-propilfenol. Además, los expertos en la técnica pueden establecer condiciones de reacción en la eliminación de dicho compuesto fenólico, es decir, la concentración y la temperatura del peróxido de hidrógeno, el tipo y el pH de un sistema (por ejemplo, un tampón) en el que el polipéptido HRP y el compuesto fenólico se mezclan entre sí, y así sucesivamente, según sea adecuado de acuerdo con el tipo del compuesto fenólico.

### 15 [Ejemplos]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente basándose en los ejemplos y ejemplos comparativos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los ejemplos a continuación.

(Ejemplo comparativo 1)

25 Examen de expresión de la peroxidasa de rábano picante (HRP) de tipo silvestre en hongo filamentoso

En primer lugar, se transformó un hongo filamentoso (*Trichoderma viride*) usando una secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de HRP de tipo silvestre, y se examinó una expresión del polipéptido de HRP en los transformantes resultantes mediante el siguiente método.

30 (1) Preparación del gen HRP C1a de tipo silvestre

Como la secuencia del gen HRP HR1 de tipo silvestre, la secuencia de bases (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3) descrita en "Eur. J. Biochem., 1988, vol. 173, iss. 3, págs 681 a 687" se usó para sintetizar artificialmente el gen de HRP de tipo silvestre. En la síntesis artificial, se añadió un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción Stul y un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción XhoI a la secuencia, respectivamente cadena arriba del codón de iniciación y cadena abajo del codón de parada. A continuación, el gen de HRP de tipo silvestre sintetizado resultante se insertó en pMA-T que se había tratado con una enzima de restricción SfiI. Por tanto, se obtuvo un plásmido "pHRP\_nativo".

40 (2) Construcción del plásmido de expresión de HRP de tipo silvestre "pCB1-HRP\_nativo"

El plásmido "pHRP\_nativo" se escindió con Stul y XhoI para así obtener aproximadamente 1 kpb de un fragmento de gen "HRP\_nativo". Por otro lado, un plásmido "pCB1-Eg3X-sin hph" (véase la publicación internacional n.º WO2011/021616) se escindió con Stul y XhoI para recoger aproximadamente 6 kpb de un fragmento. A esto, se ligó "HRP\_nativo" usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa, Mighty Mix (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para preparar así un plásmido "pCB1-HRP\_nativo". Las condiciones de reacción tales como las enzimas estaban de acuerdo con las condiciones en las instrucciones adjuntas al kit. La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "pCB1-HRP\_nativo" se determinó usando el kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 (fabricado por Applied Biosystems Inc.) y el analizador genético ABI PRISM® (fabricado por Applied Biosystems Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto. El plásmido "pCB1-HRP\_nativo" se construyó para expresar un polipéptido de HRP en el huésped *Trichoderma viride* usando el propio codón de iniciación.

(3) Preparación de transformante de *Trichoderma viride* por el plásmido "pCB1-HRP\_nativo"

55 *Trichoderma viride* se transformó con el plásmido "pCB1-HRP\_nativo" de acuerdo con el método descrito en la publicación Internacional n.º WO2005/056787. La transformación se llevó a cabo mediante un método de cotransformación usando una cepa 2 de *Trichoderma viride* deficiente para un gen de biosíntesis de uracilo (pyr4) como huésped y un gen pyr4 de *Neurospora crassa* como marcador de selección. La cepa 2 *Trichoderma viride* se cultivó en 50 ml de un medio de formación de células fúngicas (1 % de extracto de levadura, 1% de extracto de malta, 2 % de polipéptido, 2,5 % de glucosa, 0,1 % de fosfato de hidrógeno dipotásico, 0,05 % de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,0001 % de uridina (pH 7,0)) a 28 °C durante 24 horas, y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para recoger las células fúngicas. Las células fúngicas obtenidas se lavaron con 0,5 mol/l de sacarosa y se suspendieron en una solución de enzima formadora de protoplastos (1 mg/ml de β-glucuronidasa, 0,3 mg/ml de quitinasa, 0,3 mg/ml de zimoliasa, 0,5 mol/l de sacarosa) que se había filtrado a través de algodón. El resultante se agitó a 30 °C durante 60 minutos, de modo que la hifa se formó en un protoplasto. Esta suspensión se filtró y luego se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para recoger el protoplasto, que se lavó con un tampón

SUTC (0,5 mol/l de sacarosa, 10 mmol/l de cloruro cálcico, 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5)).

El protoplasto se suspendió en 100 µl de un tampón SUTC, y luego se añadieron 7 µl de una solución de ADN que contenía 7 µg del plásmido "pCB1-HRP\_nativo" y 3 µl de una solución de ADN que contenía el gen pyr4. La mezcla se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron a la misma 400 µl de una solución de PEG (60 % de PEG4000, 10 mmol/l de cloruro de calcio, 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5)), y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron a la misma 10 ml de un tampón SUTC y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El protoplasto así recogido se suspendió en 1 ml de un tampón SUTC, y cada 200 µl de la suspensión se superpuso junto con agar blando en un medio mínimo que contenía 0,5 mol/l de sacarosa, seguido de cultivo a 28 °C durante 5 días. Posteriormente, las colonias cultivadas se transfirieron de nuevo a un medio mínimo. Las colonias formadas luego se usaron como transformantes.

#### (4) Cultivo e identificación de transformante por "pCB1-HRP\_nativo"

Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio mínimo después de la introducción del plásmido "pCB1-HRP\_nativo" y se cultivó a 28 °C en un medio P (1,0 % de glucosa, 4,0 % de lactosa, 2,0 % de torta de soja, 1,0 % de extracto de levadura, 0,5 % de fosfato de potasio, 0,2 % de sulfato de amonio, 0,2 % de carbonato de calcio, 0,03 % de sulfato de magnesio), usando un matraz de acuerdo con el método descrito en la publicación internacional n.º WO98/11239 (WO98-11239A). A continuación, con el fin de comprobar si se expresaba HRP o no, el sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % (fabricado por TEFCO), y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). Se realizó una transferencia Western usando un anticuerpo anti-HRP (fabricado por JIRL Co., número de producto: 123-055-021) en la membrana de PVDF transferida. La Figura 1 muestra el resultado obtenido.

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 1, no se detectó ninguna banda procedente de HRP mediante la transferencia de Western usando el anticuerpo anti-HRP del sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP\_nativo. Por tanto, se reveló que no se producía HRP a partir de dicho transformante obtenido transformando un hongo filamentoso usando un polinucleótido que no tiene una secuencia de bases diferente de la secuencia de base de tipo silvestre que codifica un polipéptido de HRP.

(Ejemplo 1)

Examen de expresión de polipéptido de HRP en *Humicola* por polinucleótido de HRP modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*

Del resultado anterior, con el fin de expresar un polipéptido de HRP en un hongo filamentoso a un alto nivel, se tomaron en consideración las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*. Con el fin de mejorar la eficiencia de la traducción en estas tres especies, se preparó un polinucleótido, que se modificó para tener una secuencia de bases diferente de la secuencia de bases del gen de HRP de tipo silvestre. A continuación, *Humicola (Humicola insolens)* se transformó primero usando este polinucleótido para examinar una expresión de un polipéptido de HRP en el transformante resultante. En lo sucesivo en este documento, se describirán estos métodos y los resultados obtenidos.

(1) Creación de la Tabla de codones para optimizar la expresión en las tres especies en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*

Con el fin de mejorar la eficiencia de traducción en las tres especies en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*, se creó una tabla de frecuencia de uso de codones que se muestra en la Tabla 1 teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de polipéptidos cuya expresión se observó en las tres especies. Específicamente, en los hongos de las tres especies, si una frecuencia de uso del codón era extremadamente baja (si la frecuencia de uso es inferior al 5 %) incluso en una especie de los hongos, la frecuencia de uso se estableció en "0 %". Además, para un codón que tiene una frecuencia de uso del 5 % o más en todos los hongos de las tres especies, se calculó un promedio de las frecuencias de uso de las tres o las dos especies de los hongos, y el promedio se modificó a un múltiplo de 5. De esta manera, se creó la tabla de frecuencia de uso de codones que se muestra en la Tabla 1.

[Tabla 1]

		SEGUNDA LETRA					
		.T.	.C.	.A.	.G.		
PRIMERA LETRA	T..	Phe 0	Ser 0	Tyr 0	Cys 0	..T	TERCERA LETRA
	T..	Phe 100	Ser 85	Tyr 100	Cys 100	..C	
	T..	Leu 0	Ser 0	Parada 0	Parada 0	..A	
	T..	Leu 0	Ser 0	Parada 100	T rp 100	..G	
	C..	Leu 0	Pro 20	His 0	Arg 10	..T	
	C..	Leu 80	Pro 80	His 100	Arg 90	..C	
	C..	Leu 0	Pro 0	Gln 0	Arg 0	..A	
	C..	Leu 20	Pro 0	Gln 100	Arg 0	..G	
	A..	He 0	Thr 0	Asn 0	Ser 0	..T	
	A..	Ile 100	Thr 85	Asn 100	Ser 15	..C	
	A..	He 0	Thr 0	Lys 0	Arg 0	..A	
	A..	Met 100	Thr 15	Lys 100	Arg 0	..G	
	G..	Val 10	Ala 20	Asp 5	Gly 25	..T	
	G..	Val 85	Ala 80	Asp 95	Gly 75	..C	
	G..	Val 0	Ala 0	Glu 0	Gly 0	..A	

	G..	Val 5	Ala 0	Glu 100	Gly 0	..G	
--	-----	----------	----------	------------	----------	-----	--

(2) Preparación de polinucleótido de HRP modificado con codón para optimizar la expresión en las tres especies en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*

5 Con el fin de expresar el gen de HRP como un polipéptido activo a un alto nivel en las tres especies en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, se modificó un polinucleótido de HRP. Específicamente, sobre la base de las frecuencias de uso de codones que se muestran en la Tabla 1, la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 se diseñó a partir de la secuencia de bases del gen de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3) con 28,5 % de bases alteradas (véase las Figs. 2 y 3). Obsérvese que, en la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado así  
10 diseñado, se alteraron 246 codones entre los 338 codones; en otras palabras, el 72,8 % de todos los codones fueron modificados (mutación de degeneración). A continuación, sobre la base de la información sobre esta secuencia de bases, se sintetizó artificialmente un polinucleótido de HRP modificado y se insertó en pMA-T, de forma similar a pHRP\_nativo, para obtener así un plásmido "pHRP" en el que se insertó el polinucleótido de HRP modificado con codón.

15 (3) Construcción de plásmido de expresión de polinucleótido de HRP modificado con codón "pNCE2-HRP-humicola" para *Humicola*

20 Sobre la base de la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado con codón, se diseñaron y prepararon adicionalmente los siguientes cebadores para expresar una etiqueta de His añadida al lado C-terminal de un polipéptido que se va a codificar por el polinucleótido.

HRP-huraicola-F: CCCGGATCCTGGGACAAGATGCACTTCTCCAGCTCCTCC (SEQ ID NO: 5)

HRP-humicola-R:

25 CCCGGATCCCTAGTGATGGTGATGATGGTGGTGGTGGGAGTTGGAGTTGACGACG (SEQ ID NO: 6).

A continuación, usando estos cebadores y "pHRP" como molde, se llevó a cabo la RCP. La RCP se realizó usando PrimeSTAR® Max ADN Polimerasa (fabricada por Takara Bio Inc.). La RCP se realizó en 30 ciclos constando cada uno de "98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 10 segundos". Aproximadamente 1  
30 kpb de un fragmento de ADN así amplificado se escindió con BamHI para así obtener aproximadamente 1 kpb de un fragmento de gen "HRP-humicola". Por otro lado, un plásmido "pJND-c5" (véase la publicación internacional n.º WO01/090375 (WO 01-090375 A)) se escindió con BamHI para recoger aproximadamente 8 kpb de un fragmento. A esto, se ligó HRP-humicola usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa Mighty Mix para preparar así un plásmido "pNCE2-HRP-humicola". La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "pNCE2-HRP-humicola" se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). El plásmido "pNCE2-HRP-humicola" se construyó para expresar un polipéptido de HRP en el huésped *Humicola insolens* usando el propio codón de iniciación.

40 (4) Preparación de transformante de *Humicola insolens* por el plásmido "pNCE2-HRP\_nativo"

*Humicola insolens* se transformó con el plásmido "pNCE2-HRP-humicola" de acuerdo con el método descrito en el documento WO 01-090375 A. La transformación se llevó a cabo usando una cepa MN200-1 de *Humicola insolens* como huésped e higromicina como marcador de selección. La cepa *Humicola insolens* MN200-1 se cultivó en un medio (S) a 37 °C. Después de 24 horas, las células fúngicas se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante  
45 10 minutos. La composición del medio (S) fue: 3,0 % de glucosa, 2,0 % de extracto de levadura, 0,1 % de peptona, 0,03 % de cloruro de calcio y 0,03% de cloruro de magnesio, con pH 6,8. Las células fúngicas obtenidas se lavaron con sacarosa 0,5 M y se suspendieron en 10 ml de una solución enzimática formadora de protoplastos (3 mg/ml de β-glucuronidasa, 1 mg/ml de quitinasa, 1 mg/ml de zimoliasa, sacarosa 0,5 M) que se había filtrado a través de un filtro de 0,45 μm. El resultante se agitó a 30 °C durante 60 a 90 minutos, de modo que la hifa se formó en un protoplasto. Esta suspensión se filtró y luego se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para recoger el protoplasto, que se lavó con un tampón SUTC (sacarosa 0,5 M, cloruro de calcio 10 mM, Tris-HCl 10 Mm (pH 7,5)).

El protoplasto se suspendió en 1 ml de un tampón SUTC y se añadieron 10 μg del plásmido "pNCE2-HRP-humicola". La mezcla se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron a la misma 400 μl de una solución de PEG (60 % de PEG4000, cloruro de calcio 10 mM, Tris-HCl 10 Mm (pH 7,5)), y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron a la misma 10 ml de un tampón SUTC y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El protoplasto así recogido se suspendió en 1 ml de un tampón SUTC, luego se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendió en 100 μl de un tampón SUTC. El protoplasto que se ha tratado como se describió anteriormente se superpuso junto con agar blando en un medio de regeneración YMG suplementado con higromicina (200 μg/ml) (1 % de glucosa, 0,4 % de extracto de levadura, 0,2 % de extracto de  
60 malta, 17,8 % de rafinosa, 1 % de agar, pH 6,8), seguido de cultivo a 37 °C durante 5 días. Posteriormente, las colonias cultivadas se transfirieron de nuevo a un medio YMG de regeneración suplementado con higromicina (200

µg/ml). Las colonias cultivadas sobre el mismo se usaron como transformantes.

(5) Cultivo e identificación de transformante por "pNCE2-HRP\_*humicola*"

- 5 Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio YMG de regeneración suplementado con higromicina después de la introducción del plásmido "pNCE2-HRP-*humicola*", y se cultivó de acuerdo con el método descrito en el documento WO 01-090375 A. A continuación, con el fin de comprobar si se expresaba HRP o no, el sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). Se realizó una transferencia Western usando un anticuerpo anti-etiqueta His (fabricado por MBL Co., Ltd., número de producto: D291-7) en la membrana de PVDF transferida. La Figura 4 muestra el resultado obtenido.

15 A partir de los resultados que se muestran en la Figura 4, no se detectó ninguna banda procedente de HRP mediante la transferencia de Western usando el anticuerpo anti-etiqueta His del sobrenadante de cultivo del transformante por pNCE2-HRP\_*humicola*. Por tanto, se reveló que no se producía HRP a partir de dicho transformante obtenido transformando *Humicola* usando un polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado por codón) modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*.

## 20 (Ejemplo 2)

Examen de expresión de polipéptido HRP en *Aspergillus* por polinucleótido de HRP modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*.

25 A continuación, se transformó *Aspergillus* (*Aspergillus niger*) usando el polinucleótido de HRP modificado con codón descrito anteriormente para examinar una expresión de un polipéptido de HRP en el transformante resultante.

30 Obsérvese que *Aspergillus* se transformó usando una cepa de *Aspergillus niger* pyr1 deficiente para un gen de biosíntesis de uracilo (pyr4) como huésped y un gen pyr4 procedente de *Trichoderma viride* como marcador de selección por el método descrito a continuación.

(1) Construcción del vector de expresión para *Aspergillus niger*

35 (1-1) Construcción de plásmido de expresión de *Trichoderma viride* Pyr4 "pUC-Pyr4" para el marcador de selección

En primer lugar, el gen *Trichoderma viride* pyr4 usado como marcador de selección en la transformación de *Aspergillus niger* se clonó mediante el siguiente método.

40 (1-1-1) Preparación de la biblioteca de ADN genómico de *Trichoderma viride*

45 A partir de células fúngicas de *Trichoderma viride*, el ADN genómico se aisló y se purificó de acuerdo con el método de Horiuchi et al. (véase H. Horiuchi et al., J. Bacteriol. 1988, vol. 170, págs 272 a 278). El ADN genómico aislado se digirió parcialmente con una enzima de restricción Sau3AI. Esto se ligó al brazo BamHI de un vector de fago, kit de clonación λEMBL3 (fabricado por Stratagene Corporation) usando el kit de ligadura Ver. 2 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.). Después de la precipitación con etanol, el resultante se disolvió en un tampón TE. Toda la mezcla ligada se usó para formar partículas de fago con un kit de empaquetado MaxPlax λ (fabricado por Epicentre Technologies Co.) para la infección de una cepa de *Escherichia coli* XL1-azul MRA (P2). Mediante este método, la biblioteca de ADN genómico se obtuvo con  $1,1 \times 10^4$  fagos.

50 (1-1-2) Preparación de la sonda *Trichoderma viride* Pyr4

Los siguientes cebadores se prepararon sobre la base de una secuencia divulgada de la región traducida de *Trichoderma reesei*.

55 PYRMET: ATGGCACCACACCCGACG (SEQ ID NO: 7)  
PYRSTOP: CTATCGCAGTAGCCGCTC (SEQ ID NO: 8).

60 Usando estos cebadores y el ADN genómico aislado y purificado anteriormente como molde, se llevó a cabo la RCP. La RCP se realizó usando LA Taq Polimerasa (fabricada por Takara Bio Inc.). La RCP se realizó mediante un programa ejecutado en 30 ciclos consistiendo cada uno en "94 °C durante 30 segundos, recocido durante 30 segundos y 72 °C durante 2 minutos". Aproximadamente 1100 pb de un fragmento de ADN así amplificado se insertó en un vector de plásmido pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen Corporation) de acuerdo con el protocolo adjunto. Por tanto, se obtuvo un plásmido "TOPO-PYR".

65 La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "TOPO-PYR" se analizó mediante el método

descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). La búsqueda de homología se realizó en la secuencia de bases así obtenida. Como resultado, la secuencia de bases mostró una homología con el gen *Trichoderma* PYR4. Por consiguiente, se determinó que este fragmento de ADN era una porción del gen PYR4. El fragmento de ADN se amplificó por el mismo método de RCP que antes usando el plásmido "TOPO-PYR" como molde. El producto de RCP obtenido se marcó usando el sistema ELC directo (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech Inc.) y se usó como sonda.

#### (1-1-3) Selección mediante hibridación de placas

Las placas de fago formadas anteriormente se transfirieron a una membrana de transferencia de nailon Hybond-N+ (fabricada por Amersham plc), y se trataron con álcali con hidróxido de sodio 0,4 N para desnaturalizar el ADN de fago recombinante en la membrana en cadenas simples. Después de lavar con 5 x SSC (1 x SSC: citrato trisódico 15 mM, cloruro de sodio 150 mM), el resultante se secó al aire para fijar el ADN. Después de esto, la sonda preparada anteriormente se usó para la hibridación de acuerdo con el manual del kit, seguido de la reacción de detección. La sensibilización se efectuó en una película de rayos X médica FUJI (fabricada por Fujifilm Corporation). Se obtuvieron así dos clones positivos. El ADN se preparó a partir de los clones positivos de acuerdo con el método de Maniatis et al. (J. Sambrook, EF Fritsch, y T. Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El ADN de fago se recogió usando LE392 como huésped de *Escherichia coli*. El ADN del fago preparado como se describió anteriormente se trató con PstI, y la hibridación se llevó a cabo usando la sonda. Como resultado, se detectó aproximadamente 0,8 kpb de una banda del clon de fago 1, y se detectó aproximadamente 2,2 kpb de una banda del clon de fago 2.

#### (1-1-4) Construcción de plásmido de expresión de *Trichoderma viride* Pyr4 "pUC-Pyr4"

Aproximadamente 0,8 kpb del fragmento PstI del clon del fago 1 y aproximadamente 2,2 kpb del fragmento PstI del clon del fago 2 se clonaron en pUC118, y se obtuvieron los plásmidos "pUC-PYR-clon 1" y "pUC-PYR-clon 2", respectivamente. Las secuencias de bases de los plásmidos obtenidos se analizaron mediante el método descrito en el Ejemplos comparativo 1 (2). El resultado reveló que "pUC-PYR-clon1" contenía el lado del terminador del gen Pyr4 mientras que "pUC-PYR-clon2" contenía el lado del promotor. "pUC-PYR-clon1" y "pUC-PYR-clon2" se trataron con PstI, y se subclonaron en un estado ligado en pUC118. Por tanto, se obtuvo un plásmido "pUC-Pyr4".

#### (1-2) Construcción del vector de expresión "pAmyB-pyr" para *Aspergillus niger*

Con el fin de añadir un sitio XbaI al plásmido "pUC-Pyr4", la RCP se llevó a cabo usando Tricho-pyr-N-xba y Tricho-pyr-C-xba como cebadores y "pUC-Pyr4" como molde. Aproximadamente 2,5 kpb de un fragmento de ADN así amplificado se escindió con XbaI. Por tanto, se obtuvieron aproximadamente 2,5 kpb de un fragmento del gen "Pyr4-xba".

Tricho-pyr-N-xba: GGTCTAGACTGCAGGCACTTCCAGGCA (SEQ ID NO: 9)

Tricho-pyr-C-xba: GGTCTAGAGCATGACGAATACATATCAAAC (SEQ ID NO: 10).

Por otro lado, un plásmido "pAMY" (véase la publicación internacional n.º WO97/000944) se escindió con XbaI para recoger aproximadamente 8,3 kpb de un fragmento. A esto, se ligó Pyr4-xbaI usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa, Mighty Mix para preparar así un plásmido "pAMY-Pyr4". Con el fin de añadir un sitio EcoRV al plásmido "pAMY-Pyr4", la RCP se llevó a cabo usando amyB-P-R5R y amyB-T-R5R como cebadores y "pAMY-Pyr4" como molde. Por tanto, se obtuvo un vector de expresión "pAmyB-pyr" para *Aspergillus niger*, que contenía el gen *richoderma viride* pyr4.

amyB-P-R5R: GATATCTGTGGGGTTTATTGTTTCAGAGAA (SEC ID NO: 11)

amyB-T-R5R: GATATCAGGGTGGAGAGTATATGATGGTA (SEC ID NO: 12).

#### (2) Construcción del plásmido de expresión de HRP modificado con codón "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*" para *Aspergillus*

A continuación, el gen de HRP modificado con codón se insertó en el plásmido "pAmyB-pyr" construido anteriormente. Específicamente, en primer lugar, sobre la base de la secuencia de bases del gen de HRP modificado con codón, se diseñaron y prepararon adicionalmente los siguientes cebadores para expresar una etiqueta de His añadida al lado C-terminal de un polipéptido que se va a codificar por el polinucleótido.

HRP-*Aspergillus*-F: GGCATTTATGCACTTCTCCAGCTCCTCCA (SEQ ID NO: 13)

HRP-*Aspergillus*-R: CTAGTGATGGTGATGATGGTGGTGGGAGTTGGAGTTGACGACG (SEQ ID NO: 14).

A continuación, usando estos cebadores y "pHRP" como molde, se llevó a cabo la RCP. La RCP se realizó usando PrimeSTAR© Max ADN polimerasa. Aproximadamente 1 kpb de un fragmento de ADN así amplificado se fosforiló para así obtener aproximadamente 1 kpb de un fragmento de gen "HRP-*Aspergillus*". Por otro lado, el plásmido "pAmyB-pyr" preparado en el Ejemplo 2 (1-2) se escindió con EcoRV para recoger aproximadamente 8,9 kpb de un

fragmento. A esto, se ligó aproximadamente 1 kpb del fragmento del gen "HRP-*Aspergillus*" usando el kit de ligación de ADN de TaKaRa, para preparar así un plásmido "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*". La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*" se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). El plásmido "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*" se construyó para expresar HRP en el huésped *Aspergillus niger* usando el propio codón de iniciación.

### (3) Creación de la cepa *Aspergillus niger* Pyr1

A continuación, se creó una cepa de *Aspergillus niger* pyr1 deficiente para un gen de biosíntesis de uracilo (pyr4) mediante el método descrito a continuación.

Aproximadamente  $10^9$  UFC/ml de una suspensión de esporas de una cepa NRRL337 de *Aspergillus niger* se irradió con luz UV2 a una altura de 30 cm, mientras se mezclaba suavemente. Esto se aplicó a un medio selectivo y se cultivó a 30 °C durante 7 días. Se seleccionó una cepa cultivada y, por tanto, se obtuvo una cepa *Aspergillus niger* pyr1. Este medio selectivo se preparó añadiendo 10 µg/ml de uridina y 4 mg/ml de ácido 5-fluoroorótico a un medio mínimo.

### (4) Preparación de transformante de *Aspergillus niger* por el plásmido "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*"

La transformación se llevó a cabo usando una cepa de *Aspergillus niger* pyr1 deficiente para pyr4 como huésped y el gen pyr4 como marcador de selección.

Específicamente, en primer lugar, la cepa *Aspergillus niger* pyr1 se cultivó en un medio(s) a 30 °C. Después de 24 horas, las células fúngicas se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. La composición del medio (S) fue: 3,0 % de glucosa, 2,0 % de extracto de levadura, 0,1 % de peptona, 0,03 % de cloruro de calcio y 0,03 % de cloruro de magnesio, con pH 6,8. Las células fúngicas obtenidas se lavaron con 4 % de cloruro de sodio y se suspendieron en 10 ml de una solución de enzima formadora de protoplastos (3 mg/ml de β-glucuronidasa, 1 mg/ml de quitinasa, 1 mg/ml de zimoliasa, 4 % de cloruro de sodio) que se había filtrado a través de un filtro de 0,45 µm. El resultante se agitó a 30 °C durante 60 a 90 minutos, de modo que la hifa se formó en un protoplasto. Esta suspensión se filtró y luego se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para recoger el protoplasto, que se lavó con un tampón SUTC (sacarosa 0,5 M, cloruro de calcio 10 mM, Tris -HCl 10 Mm (pH 7,5)).

El protoplasto se suspendió en 1 ml de un tampón SUTC y se añadieron 10 µg del plásmido "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*". La mezcla se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron a la misma 400 µl de una solución de PEG (60 % de PEG4000, cloruro de calcio 10 mM, Tris-HCl 10 Mm (pH 7,5)), y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron a la misma 10 ml de un tampón SUTC y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El protoplasto así recogido se suspendió en 1 ml de un tampón SUTC, luego se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y finalmente se suspendió en 100 µl de un tampón SUTC. Cada 200 µl del protoplasto que se había tratado como se describió anteriormente se superpuso junto con agar blando en un medio mínimo que contenía 0,5 mol/l de sacarosa, seguido de cultivo a 30 °C durante 5 días. Posteriormente, las colonias cultivadas se transfirieron de nuevo a un medio mínimo. Las colonias formadas se usaron luego como transformantes.

### (5) Cultivo e identificación de transformante por "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*"

Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio de regeneración mínimo después de la introducción del plásmido "pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*", se inoculó en un medio de producción y se cultivó a 30 °C durante 4 días. El sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). La transferencia Western usando el anticuerpo anti-etiqueta His se realizó en la membrana de PVDF transferida. La Figura 5 muestra el resultado obtenido.

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 5, se detectaron bandas procedentes de HRP (productos de degradación de HRP de aproximadamente 24 kDa, 22 kDa y 15 kDa) mediante transferencia de Western usando el anticuerpo anti-etiqueta His del sobrenadante de cultivo del transformante por pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*. Por tanto, se reveló que en el caso en el que *Aspergillus* se transformaba usando un polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con codón) modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*, se produjo un polipéptido HRP de dicho transformante.

### (6) Medición de la concentración de HRP en el sobrenadante de cultivo de transformante por pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus*

El sobrenadante del cultivo del transformante por pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus* se diluyó según fuera adecuado. Se añadió un reactivo de tetrametilbenzidina (fabricado por Cosmo Bio Co., Ltd.) al sobrenadante del cultivo diluido de tal manera que la concentración del transformante era de  $9 \times 10^8$  UFC/ml. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de detener la reacción añadiendo ácido sulfúrico 1 N a la misma, se midió la

absorbancia a una longitud de onda de 450 nm para calcular la cantidad de HRP. Obsérvese que, para la curva de calibración, se usó un reactivo de HRP (Wako:169-10791) fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., que se había diluido a aproximadamente 0,625 a 10 ng/ml con agua Milli Q. Como resultado, la concentración de HRP en el sobrenadante del cultivo del transformante por pAmyB-pyr-HRP-*Aspergillus* fue de 0,004 mg/l.

5

### (Ejemplo 3)

Examen de expresión de polipéptido HRP en *Trichoderma* por polinucleótido de HRP modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*.

10

A continuación, se transformó *Trichoderma* (*Trichoderma viride*) usando el polinucleótido de HRP modificado con codón descrito anteriormente para examinar una expresión de un polipéptido de HRP en el transformante resultante.

15

(1) Construcción de plásmidos de expresión de polinucleótidos de HRP modificados con codón "pCB1-HRP-*tricho*" y "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*"

Sobre la base de la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado con codón, se prepararon los siguientes cebadores.

20

RP-*tricho*-F: GGGAGGCCTGCGCATCATGCACTTCTCCAG (SEC ID NO: 15)  
 HRP-*tricho*-R: CCCCTCGAGCTAGGAGTTGGAGTTGACGAC (SEQ ID NO: 16)  
 HRP-*tricho*-R(sin His): CCCCTCGAGCTAGGAGTTGGAGTTGACGAC (SEQ ID NO: 17).

25

Usando HRP-*tricho*-F y HRP-*tricho*-R o HRP-*tricho*-F y HRP-*tricho*-R(sin His) como un conjunto de iniciadores y pHRP como molde, se llevó a cabo la RCP. La RCP se realizó usando PrimeSTAR® Max ADN polimerasa. Aproximadamente 1 kpb de cada uno de los fragmentos de ADN así amplificado se escindió con *Stu*I y *Xho*I para así obtener aproximadamente 1 kpb de cada uno de los fragmentos de genes "HRP-N" y "HRP-N (sin His)". Por otro lado, se escindió un plásmido "pCB1-Eq3X-sin hph" con *Stu*I y *Xho*I para recoger aproximadamente 6 kpb de un fragmento. A esto, se ligó uno de HRP-N y HRP-N (sin His) usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa, Mighty Mix para preparar plásmidos "pCB1-HRP-*tricho*" y "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*". Las secuencias de los fragmentos de ADN insertados clonados en los plásmidos "pCB1-HRP-*tricho*" y "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*" se analizaron mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). Los plásmidos "pCB1-HRP-*tricho*" y "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*" se construyeron cada uno para expresar la HRP en el huésped *Trichoderma viride* usando el propio codón de iniciación.

30

(2) Preparación de transformante *Trichoderma viride* por plásmido "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*"

*Trichoderma viride* se transformó con el plásmido "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*" mediante el método descrito en el Ejemplo Comparativo 1 (3).

35

(3) Cultivo e identificación de transformante por "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*"

Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio mínimo después de la introducción de uno de los plásmidos "pCB1-HRP-*tricho*" y "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*", y se cultivó a 28 °C en el medio P, usando un matraz o un recipiente fermentador de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98-11239 A. Con el fin de comprobar si se expresaba HRP o no, el sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). La transferencia Western usando el anticuerpo anti-etiqueta His se realizó en la membrana de PVDF transferida en el caso de pCB1-HRP-*tricho*, mientras que se realizó transferencia Western usando el anticuerpo anti-HRP en el caso de pCB1-HRP (sin His)-*tricho*. Las Figs. 6 y 7 muestran los resultados obtenidos.

40

45

A partir de los resultados que se muestran en las Figuras 6 y 7, se detectó una banda procedente de HRP (HRP de aproximadamente 32 kDa) tanto del sobrenadante del cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* como del sobrenadante del cultivo del transformante por pCB1-HRP (sin His)-*tricho*. Por tanto, se reveló que en el caso en el que *Trichoderma* se transformaba usando un polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con codón) modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, se produjo un polipéptido HRP de dicho transformante.

50

55

(4) Medición de la concentración de HRP y actividad de oxidación de Guayacol en sobrenadante de cultivo de transformante por "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*"

60

El sobrenadante del cultivo en el cultivo en matraz del transformante por "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*" se diluyó según fuera adecuado de una manera tal que la concentración del transformante era de  $9 \times 10^8$  UFC/ml. La concentración de HRP se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6). Como resultado, la concentración de HRP en el sobrenadante del cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* fue de 123 mg/l, mientras que la concentración de HRP en el sobrenadante del cultivo del transformante por pCB1-HRP(sin His)-*tricho* fue de 165

65

mg/l. De manera similar, el sobrenadante de cultivo en el cultivo del recipiente fermentador del transformante por "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*" se diluyó según fuera adecuado de una manera tal que la concentración del transformante era de  $9 \times 10^8$  UFC/ml. La concentración de HRP se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6). Como resultado, la concentración de HRP en el sobrenadante del cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* fue de 317 mg/l, mientras que la concentración de HRP en el sobrenadante del cultivo del transformante por pCB1-HRP(sin His)-*tricho* fue de 525 mg/l.

Además, la actividad de oxidación de guayacol se midió usando el sobrenadante de cultivo en el cultivo en matraz del transformante por "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP (Hsin His)-*tricho*". Específicamente, se añadieron 0,05 ml del sobrenadante de cultivo diluido según fuera adecuado con un tampón de fosfato (pH 7,0) a 3,05 ml de un tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía 1  $\mu$ mol de guayacol y 0,3  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno. El cambio en la absorbancia se midió a una longitud de onda de 436 nm durante 10 a 15 minutos en la reacción. Obsérvese que la actividad de oxidación de guayacol se define como una actividad de oxidación de 1  $\mu$ mol de guayacol en un minuto, y se expresa como una actividad por mg de un polipéptido contenido en un sobrenadante de cultivo (U/mg de proteína). Como resultado, la actividad de oxidación de guayacol en el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* fue de 1,54 U/mg de proteína, mientras que la actividad de oxidación de guayacol en el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP (sin His)-*tricho* fue de 7,60 U/mg de proteína. De forma similar, usando el sobrenadante de cultivo en el cultivo del recipiente fermentador del transformante por "pCB1-HRP-*tricho*" o "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*", se midió la actividad de oxidación de guayacol. Como resultado, la actividad de oxidación de guayacol en el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* fue de 3,95 U/mg de proteína, mientras que la actividad de oxidación de guayacol en el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP (sin His)-*tricho* fue de 5,49 U/mg de proteína.

#### (Ejemplo 4)

Examen de expresión del polipéptido de fusión entre HRP y *Trichoderma* CBH1 utilizando polinucleótido de HRP modificado con codón en *Trichoderma*

Mediante el método descrito más adelante se examinó si era posible o no expresar un polipéptido de fusión entre HRP y otro polipéptido en un hongo filamentoso a un alto nivel usando el polinucleótido de HRP modificado con codón descrito anteriormente.

(1) Construcción del vector de co-expresión de CBH1 "pCB1-KR" para *Trichoderma viride*

Con el fin de eliminar un sitio de unión a celulasa CBH1 de un plásmido "pCB1-Eq3X-sin hph" y de insertar un sitio HpaI y un sitio PstI en el mismo, la RCP se llevó a cabo usando *Tricho*CBH1HpaR y a *Tricho*PstF como cebadores y "pCB1-Eg3X-sin hph" como molde. Por tanto, se obtuvo un vector de coexpresión de CBH1 "pCB1-KR".

*Tricho*CBH1HpaR: GGTTAACCTGAGTAGGGCCGGGAGAGGA (SEQ ID NO: 18)

a *Tricho*PstF: GGCTGCAGTAAGGTACTCGAGCAAAGCTT (SEQ ID NO: 19).

(2) Construcción del plásmido "pCB1-KR-HRP-*tricho*" para expresar el polipéptido de fusión entre HRP y CBH1

Sobre la base de la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado con codón, se prepararon los siguientes cebadores.

HRPHpaKR: GCTATTGAGAAGCGCCAGCTCACCCCTACCTTCTACGAC (SEQ ID NO: 20)

PERAspIaC: CTAGGAGTTGGAGTTGACGAC (SEQ ID NO: 21).

Usando estos cebadores y "pHRP" como molde, se llevó a cabo la RCP. La RCP se realizó usando PrimeSTAR® Max ADN polimerasa. Aproximadamente 1 kpb de un fragmento de ADN así amplificado se fosforiló para así obtener aproximadamente 1 kpb de un fragmento de gen "HRP-Hpa". Por otro lado, se escindió el plásmido "pCB1-KR" con HpaI para recoger aproximadamente 6 kpb de un fragmento. A esto, se ligó HRP-Hpa usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa, Mighty Mix para preparar así un plásmido "pCB1-KR-HRP-*tricho*". La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "pCB1-KR-HRP-*tricho*" se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). El plásmido "pCB1-KR-HRP-*tricho*" se construyó para expresarse como un polipéptido de fusión entre CBH1 y HRP en el huésped *Trichoderma viride*.

(3) Preparación de transformante de *Trichoderma viride* por el plásmido "'pCB1-KR-HRP-*tricho*"

*Trichoderma viride* se transformó con el plásmido "pCB1-KR-HRP-*tricho*" mediante el método descrito en el Ejemplo Comparativo 1 (3).

(4) Cultivo e identificación de transformante por pCB1-KR-HRP-*tricho*

Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio mínimo después de la introducción del plásmido "pCB1-KR-HRP-

5 *tricho*" y se cultivó a 28 °C en el medio P, usando un matraz de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98-11239 A. Con el fin de comprobar si se expresaba HRP o no, el sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). La transferencia Western usando el anticuerpo anti-HRP se realizó en la membrana de PVDF transferida. La Figura 8 muestra el resultado obtenido.

10 A partir de los resultados que se muestran en la Figura 8, una banda de aproximadamente 70 kDa, es decir, el polipéptido de fusión entre CBH1 y HRP se detectó a partir del sobrenadante de cultivo del transformante mediante pCB1-KR-HRP-*tricho*. Por tanto, se reveló que en el caso en el que *Trichoderma* se transformaba usando un polinucleótido (polinucleótido de HRP modificado con codón) modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*, se produjo un polipéptido de fusión que comprende HRP de dicho transformante.

15 (5) Medición de la concentración de HRP en sobrenadante de cultivo de transformante por pCB1-KR-HRP-*tricho*

El transformante por pCB1-KR-HRP-*tricho* se cultivó a 28 °C en el medio P, usando un matraz de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98-11239 A. A continuación, el sobrenadante de cultivo resultante se diluyó según fuera adecuado de tal manera que la concentración del transformante era de  $9 \times 10^3$  UFC/ml. La concentración de HRP se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6). la concentración de HRP en el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-KR-HRP-*tricho* fue de 123 mg/l.

#### (Ejemplo 5)

25 Examen de purificación usando polipéptido de fusión entre HRP y etiqueta His utilizando polinucleótido de HRP modificado con codón

(1) Purificación por columna His Trap HP

30 Dos ml del sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* que se cultivó en el Ejemplo 3 (3) se suministraron a una columna HisTrap HP (fabricada por GE) equilibrada con tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,02 M y NaCl 0,5 M (pH 7,5). Después de lavar la columna con el tampón usado para la equilibración, el resultante se diluyó con tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,02 M, NaCl, 0,5 M e imidazol 0,5 M (pH 7,5).

35 La concentración de HRP contenida en el eluato se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6). Como resultado, se recogió HRP a una concentración de 103,9 ng/ml.

#### (Ejemplo 6)

40 Examen de purificación usando polipéptido de fusión entre HRP y *Trichoderma* CBH1 utilizando polinucleótido de HRP modificado con codón

(1) Purificación utilizando actividad de unión a Avicel

45 Diez  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-KR-HRP-*tricho* que se cultivó en el Ejemplo 4 (4) se mezclaron bien con 90  $\mu\text{l}$  de una solución de Avicel a una concentración de 2 % (tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,0), sulfato de amonio 1 M) y se dejó reposar a 25 °C durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se añadió a la solución resultante tampón de ácido acético 20 mM (pH 5,0) y sulfato de amonio 1 M, seguido de lavado con una solución de Avicel (realizada dos veces). Después de la centrifugación final, el sobrenadante se separó, y el resultante se mezcló con agua Milli Q, se dejó a 37 °C durante 10 minutos y se separó de Avicel. Después de la separación, se recogió el sobrenadante. La concentración de HRP contenida en el sobrenadante se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6). Como resultado, se recogió HRP a una concentración de 12,7 ng/ml.

#### (Ejemplo 7)

55 Prueba de degradación del pigmento achiote en polipéptido recombinante de peroxidasa de rábano picante expresado en *Trichoderma*

60 Se midió una degradación de pigmento de achiote usando el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP-*tricho* que se cultivó en el Ejemplo 3 (3). Después de añadir 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante del cultivo a 190  $\mu\text{l}$  de un tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,0) que contiene 1  $\mu\text{mol}$  de un pigmento de achiote (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 0,14  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno, la mezcla se dejó reposar a 37 °C durante un período adecuado. A continuación, se midió el cambio en la absorbancia a 454 nm. Como resultado, se detectó una disminución en la absorbancia después de 30 minutos de la reacción, lo que revela que la HRP expresada a partir del gen de HRP modificado con codón descrito anteriormente mostró una actividad de degradación del pigmento de achiote.

**(Ejemplo 8)**

Examen de expresión de polipéptido HRP en *Trichoderma* por polinucleótido de HRP adaptado solo para frecuencias de uso de codón de *Trichoderma*

5 A partir de los resultados anteriores, con el fin de expresar un polipéptido de HRP a un nivel superior en *Trichoderma* que había mostrado la mayor capacidad de producción de HRP entre las tres especies de hongos filamentosos, se preparó un polinucleótido de HRP, que se modificó para tener una secuencia de bases adaptada para el frecuencias de uso de *Trichoderma*. A continuación, se transformó *Trichoderma* usando este polinucleótido para examinar una  
 10 expresión de un polipéptido de HRP en el transformante resultante. En lo sucesivo en este documento, se describirá el método y el resultado obtenido.

(1) Creación de la Tabla de codones para optimizar la expresión en *Trichoderma*

15 Se creó una tabla de frecuencia de uso de codones que se muestra en la Tabla 2 teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones del polipéptido cuya expresión se observó en *Trichoderma* (*Trichoderma viride*).

[Tabla 2]

		SEGUNDA LETRA					
		.T.	.C.	.A.	.G.		
PRIMERA LETRA	T..	Phe 0	Ser 7,5	Tyr 0	Cys 0	..T	TERCERA LETRA
	T..	Phe 100	Ser 7,5	Tyr 100	Cys 100	..C	
	T..	Leu 0	Ser 0	Parada 0	Parada 0	..A	
	T..	Leu 0	Ser 0	Parada 100	Trp 100	..G	
	C..	Leu 0	Pro 20	His 0	Arg 0	..T	
	C..	Leu 90	Pro 80	His 100	Arg 100	..C	
	C..	Leu 0	Pro 0	Gln 0	Arg 0	..A	
	C..	Leu 10	Pro 0	Gln 100	Arg 0	..G	
	A..	He 0	Thr 5	Asn 0	Ser 0	..T	
	A..	He 100	Thr 95	Asn 100	Ser 85	..C	
	A..	He 0	Thr 0	Lys 0	Arg 0	..A	
	A..	Met 100	Thr 0	Lys 100	Arg 0	..G	

G..	Val 5	Ala 10	Asp 10	Gly 5	..T
G..	Val 95	Ala 90	Asp 90	Gly 95	..C
G..	Val 0	Ala 0	Glu 0	Gly 0	..A
G..	Val 0	Ala 0	Glu 100	Gly 0	..G

(2) Preparación de polinucleótido de HRP modificado con codón para optimizar la expresión en *Trichoderma*

5 Con el fin de expresar el gen de HRP como una proteína activa a un alto nivel en *Trichoderma* (*Trichoderma viride*), se modificó un polinucleótido de HRP. Específicamente, sobre la base de las frecuencias de uso de codones mostradas en la Tabla 2, se diseñó una secuencia de bases de SEQ ID NO: 22 a partir de la secuencia de bases del gen de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3) con 29,9 % de bases alteradas. Obsérvese que, en la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado así diseñado, se alteraron 242 codones entre los 338 codones; en otras palabras, el 71,6 % de todos los codones fueron modificados (mutación de degeneración).  
10 A continuación, sobre la base de la información sobre esta secuencia de bases, se sintetizó artificialmente un polinucleótido de HRP modificado y se insertó en pMA-T, de forma similar a pHRP\_nativo, para obtener así un plásmido "pHRP-2" en el que se insertó el polinucleótido de HRP modificado con codón.

15 (3) Construcción de plásmido de expresión de polinucleótido de HRP modificado con codón "pCB1-HRP(sin His)-tricho-2"

Sobre la base de la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado con codón, se prepararon los siguientes cebadores. HRP-tricho-2-F: GGGAGGCCTGCGCATCATGCACTTCA (SEQ ID NO: 24) HRP-tricho-2-R(sin His): CCCGTCGACGCTGTTGCTGTTGACGACGCGGCAGTT (SEQ ID NO: 25).  
20

Usando HRP-tricho-2-F y HRP-tricho-R o HRP-tricho-2-R (sin His) como un conjunto de cebadores y pHRP-2 como molde, se llevó a cabo la RCP. La RCP se realizó usando PrimeSTAR® Max ADN polimerasa. Aproximadamente 1 kpb de un fragmento de ADN así amplificado se escindió con *Stu*I y *Sal*I para así obtener aproximadamente 1 kpb de un fragmento de gen "HRP-N (sin His)-2". Por otro lado, se escindió un plásmido "pCB1-Eg3X-sin hph" con *Stu*I y *Xho*I para recoger aproximadamente 6 kpb de un fragmento. A esto, se ligó HRP-N (sin His)-2 usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa, Mighty Mix para preparar así un plásmido "pCB1-HRP(sin His)-tricho-2". La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "pCB1-HRP (sin His)-tricho-2" se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). El plásmido "pCB1-HRP (sin His)-tricho-2" se construyó para expresar HRP en el huésped *Trichoderma viride* usando el propio codón de iniciación.  
25  
30

(4) Preparación de transformante de *Trichoderma* por el plásmido "pCB1-HRP (sin His)-tricho-2"

*Trichoderma* (*Trichoderma viride*) se transformó con el plásmido "pCB1-HRP(sin His)-tricho-2" mediante el método descrito en el Ejemplo Comparativo 1 (3).  
35

(5) Cultivo e identificación de transformante por pCB1-HRP(sin His)-tricho-2"

Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio mínimo después de la introducción del plásmido "pCB1-HRP(sin His)-tricho-2" y se cultivó a 28 °C en el medio P, usando un matraz de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98-11239 A. Con el fin de comprobar si se expresaba HRP o no, el sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). La transferencia Western usando el anticuerpo anti-HRP se realizó en la membrana de PVDF transferida. La Figura 9 muestra el resultado obtenido.  
40

(6) Medición de la concentración de HRP en sobrenadante de cultivo de transformante por "pCB1-HRP(Hisless)-tricho-2"

El sobrenadante del cultivo en el cultivo en matraz del transformante por "pCB1-HRP(sin His)-tricho" se diluyó según fuera adecuado de una manera tal que la concentración del transformante era de  $9 \times 10^8$  UFC/ml. La concentración de HRP se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6).  
50

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 9, se detectó una banda procedente de HRP1 (HRP de

aproximadamente 32 kDa) del sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP (sin His)-*tricho*-2. Sin embargo, la concentración de HRP en el sobrenadante de cultivo en el cultivo en matraz del transformante por pCB1-HRP (sin His)-*tricho*-2 fue de 24 mg/l y significativamente baja en comparación con la del transformante por "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*"(165 mg/l, véase el Ejemplo 3).

Por tanto, se reveló que un polipéptido de HRP se producía en una cantidad mayor en el caso en el que *Trichoderma* se transformaba usando el polinucleótido modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma* que el caso en el que *Trichoderma* se transformaba usando el polinucleótido adaptado solo para las frecuencias de uso de codones de *Trichoderma*.

### (Ejemplo 9)

Examen de expresión (2) de polipéptido HRP en *Trichoderma* por polinucleótido de HRP modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*.

A partir de los resultados anteriores, con el fin de comprobar la efectividad de la secuencia de bases diseñada teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*, se preparó un polinucleótido, que se modificó teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos y tenían una secuencia diferente de la del polinucleótido de HRP modificado con codón descrito en los Ejemplos 1 a 3. A continuación, se transformó *Trichoderma* usando el polinucleótido para examinar una expresión de un polipéptido de HRP en el transformante resultante. En lo sucesivo en este documento, se describirá el método y el resultado obtenido.

(1) Preparación de polinucleótido de HRP modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*.

Con el fin de expresar el gen de HRP como una proteína activa a un alto nivel en *Trichoderma*, se modificó un polinucleótido de HRP. Específicamente, sobre la base de las frecuencias de uso de codones que se muestran en la Tabla 1, la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26 se diseñó a partir de la secuencia de bases del gen de HRP de tipo silvestre (secuencia de bases de SEQ ID NO: 3) with 28,0% de bases alteradas.

Obsérvese que, en la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado así diseñado, se alteraron 245 codones entre los 338 codones; en otras palabras, el 72,5 % de todos los codones fueron modificados (mutación de degeneración) ( véase las Figs 10 y 11). Además, el número de bases diferentes fue de diez entre la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado diseñado en este Ejemplo (1017 bases) y la secuencia de bases del polinucleótido de HRP modificado con codón descrito en los Ejemplos 1 a 3 (1017 bases), y la homología fue del 99 % (véase las Figs. 12 y 13).

A continuación, sobre la base de la información sobre esta secuencia de bases, se sintetizó artificialmente un polinucleótido de HRP modificado y se insertó en pMA-T, de forma similar a pHRP\_nativo, para obtener así un plásmido "pHRP-3" en el que se insertó el polinucleótido de HRP modificado con codón.

(2) Construcción de plásmido de expresión de polinucleótido de HRP modificado con codón "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*-3"

Los plásmidos "pHRP-3" y "pCB1-Eq3X-sin hph" se escindieron con *Stu*I y *Xho*I para recoger aproximadamente 1 kpb y aproximadamente 6 kpb de fragmentos. Los dos se ligaron usando el kit de ligadura de ADN de TaKaRa, Mighty Mix para preparar un plásmido "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*-3". La secuencia del fragmento de ADN insertado clonado en el plásmido "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*-3" se analizó mediante el método descrito en el Ejemplo comparativo 1 (2). El plásmido "pCB1-HRP (sin His)-*tricho*-3" se construyó para expresar HRP en el huésped *Trichoderma viride* usando el propio codón de iniciación.

(4) Preparación de transformante de *Trichoderma* por el plásmido ""pCB1-HRP (sin His)-*tricho*-3"

*Trichoderma* (*Trichoderma viride*) se transformó con el plásmido "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*-3" mediante el método descrito en el Ejemplo Comparativo 1 (3).

(5) Cultivo e identificación de transformante por pCB1-HRP(sin His)-*tricho*-3"

Se seleccionó una cepa que se cultivó en el medio mínimo después de la introducción del plásmido "pCB1-HRP(sin His)-*tricho*-3" y se cultivó a 28 °C en el medio P, usando un matraz de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98-11239 A. Con el fin de comprobar si se expresaba HRP o no, el sobrenadante de cultivo resultante se separó por electroforesis usando gel SDS-PAGE mini al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore Corporation). La transferencia Western usando el anticuerpo anti-HRP se realizó en la membrana de PVDF transferida. La Figura 14 muestra el resultado obtenido.

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 14, se detectó una banda procedente de HRP (HRP de aproximadamente 32 kDa) del sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP (sin His)-*tricho-3*.

5 (6) Medición de la concentración de HRP en sobrenadante de cultivo de transformante por "pCB1-HRP(Hisless)-*tricho-3*"

10 El transformante por "pCB1-HRP (sin His)-*tricho-3*" se cultivó a 28 °C en el medio P, usando un matraz de acuerdo con el método descrito en el documento WO 98-11239A. A continuación, el sobrenadante de cultivo se diluyó según fuera adecuado de tal manera que la concentración del transformante fue de  $9 \times 10^8$  UFC/ml. La concentración de HRP se midió de acuerdo con el Ejemplo 2 (6). Como resultado, la concentración de HRP en el sobrenadante de cultivo del transformante por pCB1-HRP(sin His)-*tricho-3* fue de 200 mg/l.

15 Por tanto, se confirmó, de forma análoga a los Ejemplos 2 a 5, que en el caso en el que un hongo filamentoso se transformaba usando un polinucleótido modificado teniendo en cuenta las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, se produjo un polipéptido HRP de dicho transformante.

### [Aplicabilidad Industrial]

20 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención permite producir eficientemente una gran cantidad de un polipéptido de peroxidasa de rábano picante introduciendo en un hongo filamentoso un polinucleótido modificado para tener codón(es) cuya secuencia de bases es diferente de una secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante (HPR). La frecuencia de uso del(los) codon(es) modificado(s) corresponde a las frecuencias de uso de codones de las tres especies de hongos filamentosos en *Humicola*, *Aspergillus*, y *Trichoderma*.

30 Por lo tanto, el polinucleótido y el método para producir un polipéptido HRP usando el polinucleótido de la presente invención son excelentes para producir eficientemente una gran cantidad de una isoenzima HRP uniforme, y en consecuencia son útiles en la producción de enzimas para detección, enzimas para kits de inspección clínica y similares en diversas pruebas tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, el método inmunohistoestático, el método de transferencia de Southern y el método de transferencia de Western.

[Texto libre de la lista de secuencias]

35 SEQ ID NOs: 1 y 26  
 <223> Secuencias de polinucleótidos sintetizados artificialmente en las que las frecuencias de uso de codones están adaptadas para *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus* SEQ ID NO: 2  
 <223> Polipéptido codificado por el polinucleótido sintetizado artificialmente que tiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 SEQ ID NOs: 5 a 21, 24, y 25  
 40 <223> Secuencias de cebador sintetizado artificialmente SEQ ID NO: 22  
 <223> Secuencia de polinucleótidos sintetizados artificialmente en la que las frecuencias de uso de codones están adaptadas para *Trichoderma* SEQ ID NO: 23  
 <223> Polipéptido codificado por el polinucleótido sintetizado artificialmente que tiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 27  
 45 <223> Polipéptido codificado por el polinucleótido sintetizado artificialmente que tiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26

### LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Meiji Seika Pharma Co., Ltd.  
 <120> MÉTODO PARA PRODUCIR PEROXIDASA DE RÁBANO PICANTE RECOMBINANTE USANDO HONGOS FILAMENTOSOS  
 <130> IBPF13-513WO  
 <150> JP2012/124598  
 55 <151> 2012-05-31  
 <160> 27  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 1017  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencias de polinucleótidos sintetizados artificialmente en las que el uso de codones está adaptado para *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus*  
 65 <220>  
 <221> CDS

ES 2 682 271 T3

<222> (1)..( 1017)  
 <223>  
 <400> 1

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

ES 2 682 271 T3

210	215	220	
ccc acc ctc aac acc acc tac ctg cag acc ctc cgc ggc ctc tgc ccc			720
Pro Thr Leu Asn Thr Thr Tyr Leu Gln Thr Leu Arg Gly Leu Cys Pro			
225	230	235	240
ctc aac ggc aac ctc tcc gcc ctc gtg gac ttc gac ctc cgc acc ccc			768
Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Leu Val Asp Phe Asp Leu Arg Thr Pro			
	245	250	255
acc atc ttc gat aac aag tac tac gtc aac ctg gag gag cag aag ggc			816
Thr Ile Phe Asp Asn Lys Tyr Tyr Val Asn Leu Glu Glu Gln Lys Gly			
	260	265	270
ctc atc cag tcc gac cag gag ctg ttc tcc tcc ccc aac gcc acc gac			864
Leu Ile Gln Ser Asp Gln Glu Leu Phe Ser Ser Pro Asn Ala Thr Asp			
	275	280	285
acg atc ccc ctg gtc cgc tcc ttc gcc aac tcc acc cag acg ttc ttc			912
Thr Ile Pro Leu Val Arg Ser Phe Ala Asn Ser Thr Gln Thr Phe Phe			
	290	295	300
aac gcc ttc gtc gag gcc atg gac cgc atg ggc aac atc acc ccc ctc			960
Asn Ala Phe Val Glu Ala Met Asp Arg Met Gly Asn Ile Thr Pro Leu			
305	310	315	320
acc ggc acc cag gcc cag atc cgc ctc aac tgc cgc gtc gtc aac tcc			1008
Thr Gly Thr Gln Gly Gln Ile Arg Leu Asn Cys Arg Val Val Asn Ser			
	325	330	335
aac tcc tag			1017
Asn Ser			

<210> 2

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido codificado por el polinucleótido sintetizado artificialmente que tiene la secuencia de bases de SEQ ID:1

10 <400> 2

```

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

Pro Thr Leu Asn Thr Thr Tyr Leu Gln Thr Leu Arg Gly Leu Cys Pro
225          230          235          240
Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Leu Val Asp Phe Asp Leu Arg Thr Pro
245          250          255
Thr Ile Phe Asp Asn Lys Tyr Tyr Val Asn Leu Glu Glu Gln Lys Gly
260          265          270
Leu Ile Gln Ser Asp Gln Glu Leu Phe Ser Ser Pro Asn Ala Thr Asp
275          280          285
Thr Ile Pro Leu Val Arg Ser Phe Ala Asn Ser Thr Gln Thr Phe Phe
290          295          300
Asn Ala Phe Val Glu Ala Met Asp Arg Met Gly Asn Ile Thr Pro Leu
305          310          315          320
Thr Gly Thr Gln Gly Gln Ile Arg Leu Asn Cys Arg Val Val Asn Ser
325          330          335

Asn Ser

```

```

<210> 3
<211> 1014
5 <212> ADN
<213> Rábano picante
<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..( 1014)
<223>
<400> 3

```

ES 2 682 271 T3

atg	cat	ttc	tct	tct	tct	tct	act	ttg	ttc	act	tgt	ata	acc	tta	atc	48
Met	His	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Phe	Thr	Cys	Ile	Thr	Leu	Ile	
1			5					10					15			
cca	ttg	gta	tgt	ctt	att	ctt	cat	gct	tct	ttg	tct	gat	gct	caa	ctt	96
Pro	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Ser	Asp	Ala	Gln	Leu	
			20					25					30			
acc	cct	acc	ttc	tac	gac	aat	tca	tgt	cct	aat	gtc	tct	aac	atc	gta	144
Thr	Pro	Thr	Phe	Tyr	Asp	Asn	Ser	Cys	Pro	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Val	
		35					40					45				
cgg	gat	act	att	gtc	aat	gag	cta	aga	tca	gac	cct	cgt	att	gcc	gcg	192
Arg	Asp	Thr	Ile	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Ser	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	
	50					55					60					
agc	atc	ctt	cgt	ctt	cac	ttc	cac	gac	tgc	ttt	gtt	aat	ggg	tgt	gac	240
Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Phe	His	Asp	Cys	Phe	Val	Asn	Gly	Cys	Asp	
65					70					75				80		
gca	tcg	atc	ttg	tta	gac	aac	aca	aca	tca	ttt	cga	aca	gag	aaa	gat	288
Ala	Ser	Ile	Leu	Leu	Asp	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Arg	Thr	Glu	Lys	Asp	
				85					90					95		
gcg	ttt	gga	aac	gca	aac	tcg	gca	aga	gga	ttt	cca	gtg	att	gat	aga	336
Ala	Phe	Gly	Asn	Ala	Asn	Ser	Ala	Arg	Gly	Phe	Pro	Val	Ile	Asp	Arg	
			100					105					110			
atg	aaa	gcc	gcg	gtg	gag	agt	gca	tgc	cca	aga	acc	gtt	tca	tgc	gca	384
Met	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Cys	Pro	Arg	Thr	Val	Ser	Cys	Ala	
		115					120					125				
gat	ttg	ctc	acc	att	gca	gct	caa	caa	tct	gtc	act	ttg	gcg	gga	ggg	432
Asp	Leu	Leu	Thr	Ile	Ala	Ala	Gln	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	Ala	Gly	Gly	
						135						140				
cct	tct	tgg	aga	gtt	cct	ttg	ggc	aga	aga	gat	agc	tta	caa	gca	ttt	480
Pro	Ser	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Asp	Ser	Leu	Gln	Ala	Phe	
145					150					155					160	
ctg	gat	ctt	gct	aat	gca	aat	ctt	cca	gct	cca	ttc	ttc	aca	ctt	cca	528
Leu	Asp	Leu	Ala	Asn	Ala	Asn	Leu	Pro	Ala	Pro	Phe	Phe	Thr	Leu	Pro	
				165					170					175		
caa	ctt	aaa	gac	agc	ttt	aga	aat	gtt	ggc	ctc	aac	cgt	tct	tct	gat	576
Gln	Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Arg	Asn	Val	Gly	Leu	Asn	Arg	Ser	Ser	Asp	
			180					185					190			
ctc	ggt	gca	ctg	tcc	ggg	ggc	cac	aca	ttt	ggg	aaa	aat	cag	tgt	cgg	624

ES 2 682 271 T3

Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gly	His	Thr	Phe	Gly	Lys	Asn	Gln	Cys	Arg	
		195					200					205				
ttt	att	atg	gac	aga	tta	tac	aac	ttc	agc	aac	acc	ggg	tta	ccc	gat	672
Phe	Ile	Met	Asp	Arg	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ser	Asn	Thr	Gly	Leu	Pro	Asp	
	210					215				220						
cct	act	ctc	aac	act	act	tat	ctc	caa	act	ctt	cgt	gga	cta	tgt	ccc	720
Pro	Thr	Leu	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Cys	Pro	
225					230					235					240	
ctc	aat	ggg	aat	cta	agc	gct	ttg	gtg	gat	ttt	gat	cta	cgt	acg	cca	768
Leu	Asn	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Leu	Arg	Thr	Pro	
			245						250					255		
acg	att	ttt	gac	aac	aaa	tac	tat	gtg	aat	ctc	gaa	gag	caa	aaa	gga	816
Thr	Ile	Phe	Asp	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asn	Leu	Glu	Glu	Gln	Lys	Gly	
		260					265						270			
ctt	atc	caa	agc	gac	caa	gag	ttg	ttc	tct	agc	ccc	aat	gcc	act	gac	864
Leu	Ile	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	Asn	Ala	Thr	Asp	
		275				280						285				
aca	atc	cct	ttg	gtg	aga	tca	ttt	gct	aat	agc	aca	caa	aca	ttc	ttc	912
Thr	Ile	Pro	Leu	Val	Arg	Ser	Phe	Ala	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Phe	Phe	
	290					295					300					
aat	gca	ttt	gtg	gag	gcg	atg	gat	agg	atg	gga	aac	att	aca	cct	ctt	960
Asn	Ala	Phe	Val	Glu	Ala	Met	Asp	Arg	Met	Gly	Asn	Ile	Thr	Pro	Leu	
305					310					315					320	
aca	gga	act	caa	gga	cag	atc	agg	ttg	aat	tgt	agg	gtg	gtg	aac	tcc	1008
Thr	Gly	Thr	Gln	Gly	Gln	Ile	Arg	Leu	Asn	Cys	Arg	Val	Val	Asn	Ser	
				325					330					335		
aac	tct															1014
Asn	Ser															

<210> 4  
 <211> 338  
 <212> PRT  
 <213> Rábano picante  
 <400> 4

5

ES 2 682 271 T3

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

<210> 5  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente

5  
 <400> 5  
 10 cccggatcct gggacaagat gcactctcc agctcctcc 39

<210> 6  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente

15  
 <400> 6  
 cccggatccc tagtgatggt gatgatggtg gtgggtgggag ttggagtga cgacg 55

ES 2 682 271 T3

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 7  
 atggcaccac acccgacg 18  
 <210> 8  
 10 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 15 <400> 8  
 ctatcgcagt agccgctc 18  
 <210> 9  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 9  
 ggtctagact gcaggcactt ccaggca 27  
 25 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 10  
 ggtctagacg atgacgaata catatcaaac 30  
 <210> 11  
 <211> 29  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 11  
 40 gatatctgtg gggttattg tcagagaa 29  
 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 12  
 gatatcaggg tggagagtat atgatgga 29  
 <210> 13  
 50 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 13  
 55 ggcatttatg cacttctcca gctctcca 29  
 <210> 14  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 60 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 14  
 65 ctagtgatgg tgatgatggt ggtggtggga gttggagtg acgacg 46  
 <210> 15  
 <211> 30

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 5 <400> 15  
 gggaggcctg cgcacatgc acttctccag 30  
 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 16  
 cccctcgagc taggagttgg agttgacgac 30  
 15 <210> 17  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 17  
 cccctcgagc taggagttgg agttgacgac 30  
 <210> 18  
 <211> 28  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 18  
 30 ggtaacctg agtagggccg ggagagga 28  
 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 19  
 ggctgcagta aggtactcga gcaaaagctt 30  
 <210> 20  
 40 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 45 <400> 20  
 gctattgaga agcggcagct caccctacc ttctacgac 39  
 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 21  
 55 ctaggagttg gagtgacga c 21  
 <210> 22  
 <211> 1017  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Secuencia del polinucleótido sintetizado artificialmente en la que el uso de codones está adaptado para  
*Trichoderma* <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..( 1017)  
 <223>  
 65 <400> 22

ES 2 682 271 T3

atg cac ttc agc agc agc agc acc ctc ttc act tgc atc acc ctc atc	48
Met His Phe Ser Ser Ser Ser Thr Leu Phe Thr Cys Ile Thr Leu Ile	
1                   5                   10                   15	
ccc ctc gtc tgc ctc atc ctc cac gcc agc ctc agc gac gcc cag ctc	96
Pro Leu Val Cys Leu Ile Leu His Ala Ser Leu Ser Asp Ala Gln Leu	
20                   25                   30	
acc ccc acc ttc tac gac aac agc tgc ccc aac gtc agc aac atc gtc	144

ES 2 682 271 T3

Thr	Pro	Thr	Phe	Tyr	Asp	Asn	Ser	Cys	Pro	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Val		
		35					40					45					
cgc	gac	acc	atc	gtc	aac	gag	ctg	cgc	agc	gac	ccc	cgc	atc	gcc	gcc		192
Arg	Asp	Thr	Ile	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Ser	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala		
		50				55					60						
agc	atc	ctc	cgc	ctc	cac	ttc	cac	gac	tgc	ttc	gtt	aac	ggc	tgc	gac		240
Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Phe	His	Asp	Cys	Phe	Val	Asn	Gly	Cys	Asp		
65					70					75				80			
gcc	tcc	atc	ctc	ctc	gac	aac	acc	acc	agc	ttc	cgc	acc	gag	aag	gac		288
Ala	Ser	Ile	Leu	Leu	Asp	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Arg	Thr	Glu	Lys	Asp		
				85					90					95			
gcc	ttc	ggc	aac	gcc	aac	agc	gct	cgc	ggc	ttc	ccc	gtc	atc	gac	cgc		336
Ala	Phe	Gly	Asn	Ala	Asn	Ser	Ala	Arg	Gly	Phe	Pro	Val	Ile	Asp	Arg		
			100					105					110				
atg	aag	gcc	gac	gtc	gag	agc	gcc	tgc	cct	cgc	acc	gtc	agc	tgc	gcc		384
Met	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Cys	Pro	Arg	Thr	Val	Ser	Cys	Ala		
		115					120					125					
gac	ctc	ctc	act	atc	gcc	gcc	cag	cag	agc	gtc	acc	ctc	gcc	ggc	ggc		432
Asp	Leu	Leu	Thr	Ile	Ala	Ala	Gln	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	Ala	Gly	Gly		
			130				135					140					
cct	agc	tgg	cgc	gtc	cct	ctc	ggc	cgc	cgc	gac	agc	ctc	cag	gct	ttc		480
Pro	Ser	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Asp	Ser	Leu	Gln	Ala	Phe		
145					150					155				160			
ctc	gac	ctc	gcc	aac	gcc	aac	ctg	cct	gcc	ccc	ttc	ttc	acc	ctg	ccc		528
Leu	Asp	Leu	Ala	Asn	Ala	Asn	Leu	Pro	Ala	Pro	Phe	Phe	Thr	Leu	Pro		
				165					170					175			
cag	ctc	aag	gac	agc	ttc	cgc	aac	gtc	ggc	ctc	aac	cgc	agc	tcc	gac		576
Gln	Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Arg	Asn	Val	Gly	Leu	Asn	Arg	Ser	Ser	Asp		
			180					185					190				
ctc	gtc	gcc	ctc	tct	ggc	ggc	cac	acc	ttc	ggc	aag	aac	cag	tgc	cgc		624
Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gly	His	Thr	Phe	Gly	Lys	Asn	Gln	Cys	Arg		
			195				200						205				
ttc	atc	atg	gac	cgc	ctc	tac	aac	ttc	agc	aac	acc	ggc	ctc	ccc	gac		672
Phe	Ile	Met	Asp	Arg	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ser	Asn	Thr	Gly	Leu	Pro	Asp		
		210				215						220					
ccc	acc	ctc	aac	acc	acc	tac	ctc	cag	acc	ctc	cgc	ggc	ctc	tgc	ccc		720
Pro	Thr	Leu	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Cys	Pro		
225					230						235			240			
ctc	aac	ggc	aac	ctc	agc	gcc	ctc	gtc	gat	ttc	gac	ctc	cgc	acc	ccc		768
Leu	Asn	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Leu	Arg	Thr	Pro		
				245					250					255			
acc	atc	ttc	gat	aac	aag	tac	tac	gtc	aac	ctc	gag	gag	cag	aag	ggc		816
Thr	Ile	Phe	Asp	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asn	Leu	Glu	Glu	Gln	Lys	Gly		
			260					265					270				
ctc	atc	cag	agc	gac	cag	gag	ctg	ttc	agc	agc	ccc	aac	gcc	acc	gac		864
Leu	Ile	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	Asn	Ala	Thr	Asp		
			275				280						285				
acc	atc	ccc	ctg	gtc	cgc	agc	ttc	gcc	aac	tct	acc	cag	acc	ttc	ttc		912
Thr	Ile	Pro	Leu	Val	Arg	Ser	Phe	Ala	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Phe	Phe		
		290				295						300					
aac	gcc	ttc	gtc	gag	gcc	atg	gac	cgc	atg	ggc	aac	atc	acc	ccc	ctc		960
Asn	Ala	Phe	Val	Glu	Ala	Met	Asp	Arg	Met	Gly	Asn	Ile	Thr	Pro	Leu		
305					310					315					320		
acc	ggc	acc	cag	ggc	cag	atc	cgc	ctc	aac	tgc	cgc	gtc	gtc	aac	agc		1008
Thr	Gly	Thr	Gln	Gly	Gln	Ile	Arg	Leu	Asn	Cys	Arg	Val	Val	Asn	Ser		
				325					330					335			
aac	agc	tag															1017
Asn	Ser																

<210> 23  
<211> 338

<212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido codificado por el polinucleótido sintetizado artificialmente  
 que tiene la secuencia de bases de SEQ ID:22  
 <400> 23

5

```

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

10 <210> 24  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
 <400> 24  
 gggaggcctg cgcatcatgc acttca 26  
 <210> 25  
 <211> 36  
 20 <212> ADN

<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia de cebador sintetizado artificialmente  
<400> 25  
5 cccgtcgacg ctgttgctgt tgacgacgcg gcagtt 36  
<210> 26  
<211> 1017  
<212> ADN  
<213> Artificial  
10 <220>  
<223> Secuencias de polinucleótidos sintetizados artificialmente en las que el uso de codones está adaptado para *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus*  
<220>  
<221> CDS  
15 <222> (1)..( 1017)  
<223>  
<400> 26

ES 2 682 271 T3

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

ES 2 682 271 T3

ctc aac ggc aac ctc tcc gcc ctc gtg gac ttc gac ctc cgc acc ccc	768
Leu Asn Gly Asn Leu Ser Ala Leu Val Asp Phe Asp Leu Arg Thr Pro	
245 250 255	
acc atc ttc gat aac aag tac tac gtc aac ctg gag gag cag aag ggc	816
Thr Ile Phe Asp Asn Lys Tyr Tyr Val Asn Leu Glu Glu Gln Lys Gly	
260 265 270	
ctc atc cag tcc gac cag gag ctg ttc tcc tcc ccc aac gcc acc gac	864
Leu Ile Gln Ser Asp Gln Glu Leu Phe Ser Ser Pro Asn Ala Thr Asp	
275 280 285	
acg atc ccc ctg gtc cgc tcc ttc gcc aac tcc acc cag acg ttc ttc	912
Thr Ile Pro Leu Val Arg Ser Phe Ala Asn Ser Thr Gln Thr Phe Phe	
290 295 300	
aac gcc ttc gtc gag gcc atg gac cgc atg ggc aac atc acc ccc ctc	960
Asn Ala Phe Val Glu Ala Met Asp Arg Met Gly Asn Ile Thr Pro Leu	
305 310 315 320	
acc ggc acc cag ggc cag atc cgc ctc aac tgc cgc gtc gtc aac tcc	1008
Thr Gly Thr Gln Gly Gln Ile Arg Leu Asn Cys Arg Val Val Asn Ser	
325 330 335	
aac tcc tag	1017
Asn Ser	

<210> 27

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido codificado por el polinucleótido sintetizado artificialmente que tiene la secuencia de bases de SEQ ID:26

10 <400> 27

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

## REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido modificado para tener al menos 200 codones cuya secuencia de bases es diferente de una secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante C1a, que tiene frecuencias de uso de codones en los siguientes porcentajes, y que es capaz de expresar el polipéptido que va a codificarse en un hongo filamentoso, en el que
- 5 en un caso en el que un aminoácido codificado por el codón modificado es alanina, una frecuencia de uso de GCC es del 77,5 % al 82,5 % y una frecuencia de uso de GCT es del 17,5 % al 22,5 %;
- 10 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es arginina, una frecuencia de uso de CGC es del 87,5 % al 92,5 % y una frecuencia de uso de CGT es del 7,5 % al 12,5 %;
- 15 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es asparagina, una frecuencia de uso de AAC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido aspártico, una frecuencia de uso de GAC del 92,5% al 97,5% y una frecuencia de uso de GAT es del 2,5 % al 7,5 %;
- 20 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es cisteína, una frecuencia de uso de TGC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glutamina, una frecuencia de uso de CAG es del 100 %;
- 25 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es ácido glutámico, una frecuencia de uso de GAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es glicina, una frecuencia de uso de GGC del 72,5 % al 77,5 % y una frecuencia de uso de GGT es del 22,5 % al 27,5 %;
- 30 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es histidina, una frecuencia de uso de CAC es del 100 %;
- 25 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es isoleucina, una frecuencia de uso de ATC es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es leucina, una frecuencia de uso de CTC es del 77,5 % al 82,5 % y una frecuencia de uso de CTG es del 17,5 % al 22,5 %;
- 30 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es lisina, una frecuencia de uso de AAG es del 100 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es fenilalanina, una frecuencia de uso de TTC es del 100 %;
- 35 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es prolina, una frecuencia de uso de CCC es del 77,5 % al 82,5 % y una frecuencia de uso de CCT es del 17,5 % al 22,5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es serina, una frecuencia de uso de AGC es del 12,5 % al 17,5 % y una frecuencia de uso de TCC es del 82,5 % al 87,5 %;
- 40 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es treonina, una frecuencia de uso de ACC es del 82,5 % al 87,5 % y una frecuencia de uso de ACG es del 12,5 % al 17,5 %;
- en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es tirosina, una frecuencia de uso de TAC es del 100 %; y
- 45 en un caso en el que el aminoácido codificado por el codón modificado es valina, una frecuencia de uso de GTC es del 82,5% al 87,5 %, una frecuencia de uso de GTG es del 2,5 % al 7,5 % y una frecuencia de uso de GTT es del 7,5 % al 12,5 %;
- la secuencia de bases de tipo silvestre que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante es la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3, y
- 50 el número de aminoácidos con las frecuencias de uso del codón en los porcentajes mencionados anteriormente son los 18 aminoácidos mencionados anteriormente.
2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante (HRP) C1a y tiene al menos una característica seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (i) y (ii):
- 55 (i) que comprende una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 1; y
- (ii) que tiene una homología del 95 % o más con una secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 1.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, que codifica un polipéptido de peroxidasa de rábano picante (HRP) C1a y tiene al menos una característica seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (i) y (ii):
- 60 (i) que comprende una región codificadora de una secuencia de bases de SEQ ID NO: 26; y
- (ii) que tiene una homología del 95 % o más con una secuencia de bases en las posiciones 91 a 1017 de SEQ ID NO: 26.
4. Un polinucleótido que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, al que se añade un polinucleótido que codifica un polipéptido deseado.
- 65 5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1

a 4.

6. Un transformante de un hongo filamentoso transformado con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 introducido.

5 7. El transformante de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el hongo filamentoso es uno cualquiera de un hongo perteneciente al género *Trichoderma* y un hongo perteneciente al género *Aspergillus*.

10 8. El transformante de acuerdo con la reivindicación 6, siendo el hongo filamentoso uno cualquiera de *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*.

9. El transformante de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el hongo filamentoso es *Trichoderma viride*.

15 10. Un método de producción de un polipéptido codificado por el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método las etapas de:

cultivar el transformante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9; y  
recoger el polipéptido expresado a partir del transformante cultivado y/o de un cultivo del transformante.

20

Fig. 1

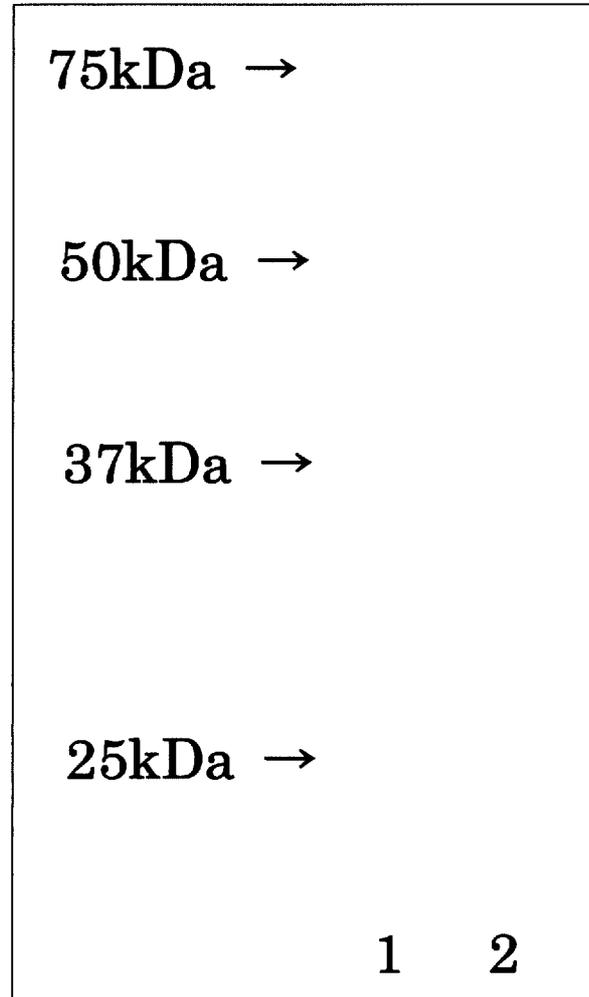


Fig. 2

```

1' ATGCATTTCT CTTCTTCTTC TACTTTGTTC ACTTGTATAA CCTTAATCCC ATTGGTATGT
   ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
1" ATGCAC TTCT CCAGCTCCTC CACCCTCTTC ACGTGCATCA CCCTCATCCC CCTCGTCTGC

61' CTTATTCTTC ATGCTTCTTT GTCTGATGCT CAACTTACCC CTACCTTCTA CGACAATTCA
   ** ** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
61" CTCATCCTCC ACGCTTCCCT GTCCGACGCC CAGCTCACCC CTACCTTCTA CGACA ACTCC

121' TGTCTAATG TCTCTAACAT CGTACGGGAT ACTATTGTCA ATGAGCTAAG ATCAGACCCT
   ** ***** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
121" TGCCCTAACG TCAGCAACAT CGTCCGCGAC ACCATCGTCA ACGAGCTCGG CTCCGACCCC

181' CGTATTGCCG CGAGCATCCT TCGTCTTAC TTCCACGACT GCTTTGTAA TGGTTGTGAC
   ***** ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
181" CGTATCGCCG CCTCCATCCT CCGCCTCCAC TTCCACGACT GCTTCGTCAA CGGTTGCGAC

241' GCATCGATCT TGTTAGACAA CACAACATCA TTTGGAACAG AGAAAGATGC GTTTGGAAC
   ** ** * ** * * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
241" GCTTCCATCC TCCTCGACAA CACCACCAGC TTCCGCACCG AGAAGGACGC CTTCGGCAAC

301' GCAAAC TCGG CAAGAGGATT TCCAGTGATT GATAGAATGA AAGCCGCGGT GGAGAGTGCA
   ** ***** * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
301" GCCAACTCCG CTCGCGGCTT CCCCCTCATC GACCGCATGA AGGCCGCGGT CGAGTCCGCC

361' TGCCCAAGAA CCGTTTCATG CGCAGATTTG CTCACCATTG CAGCTCAACA ATCTGTCACT
   ***** * * **** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
361" TGCCCTCGCA CCGTCAGCTG CGCCGACCTC CTCAGGATCG CCGCCAGCA GTCCGTCAAC

421' TTGGCGGGAG GTCCTTCTTG GAGAGTTCCT TTGGGCAGAA GAGATAGCTT ACAAGCATTT
   * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
421" CTCGCCGGTG GCCCCTCCTG GCGTGTTCCT CTCGGTCGCC GCGACTCCCT CCAGGCTTTC

481' CTGGATCTTG CTAATGCAAA TCTTCCAGCT CCATTCTTCA CACTTCCACA ACTTAAAGAC
   ** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
481" CTCGACCTCG CCAACGCCAA CCTGCCCGCT CCCTTCTTCA CCCTGCCCA GCTCAAGGAC
    
```

Fig. 3

```

541' AGCTTTAGAA ATGTTGGCCT CAACCGTTCT TCTGATCTCG TTGCACTGTC CGGGGGCCAC
    *** * * * * * ***** ***** ** ** **** **** ** ** *** ** ***
541" TCCTTCCGCA ACGTCGGCCT CAACCGCTCC TCCGACCTCG TTGCCCTCTC CGGCGGTCAC

601' ACATTTGGTA AAAATCAGTG TCGGTTTATT ATGGACAGAT TATACAATT CAGCAACACC
    ** ** * * * * * ***** ** ** * ***** * * ***** * *****
601" ACCTTCGGCA AGAACCAGTG CCGCTTCATC ATGGACCGCC TCTACAATT CTCCAACACC

661' GGTTTACCG ATCCTACTCT CAACACTACT TATCTCCAAA CTCTTCGTGG ACTATGTCCC
    ** * **** * ** * * ***** ** ** * * * * * ** ** * * ** ** **
661" GGCCTCCCG ACCCCACCCT CAACACCACC TACCTGCAGA CCCTCCGGG CCTCTGCCCC

721' CTCAATGGTA ATCTAAGCG TTTGGTGGAT TTTGATCTAC GTACGCCAAC GATTTTTGAC
    ***** ** * * * * * ** * ***** ** ** * * * * * ** ** * * *
721" CTCAACGGCA ACCTCTCGG CCTCGTGGAC TTCGACCTCC GCACCCCCAC CATCTTCGAT

781' AACAAACT ATGTGAATCT CGAAGAGCAA AAAGGACTTA TCCAAAGCGA CCAAGAGTTG
    ***** ***** * ** * * * * ** ***** ** ** * * * * * **** *** ** ** **
781" AACAACTACT ACGTCAACCT GGAGGAGCAG AAGGGCCTCA TCCAGTCCGA CCAGGAGCTG

841' TTCTCTAGCC CCAATGCCAC TGACACAATC CCTTTGGTGA GATCATTTC TAATAGCACA
    ***** ** **** ***** ***** ** ** * * * * * * * * * * ** **
841" TTCTCCTCC CCAACGCCAC CGACACGATC CCCCTGGTCC GTCCTTCGC CAACTCCACC

901' CAAACATTCT TCAATGCATT TGTGGAGCG ATGGATAGGA TGGGAAACAT TACACCTCTT
    ** ** **** ***** ** ** ** ** ***** ***** * * **** ***** ** ** **
901" CAGACGTTCT TCAACGCCTT CGTCGAGGCC ATGGACCGCA TGGGCAACAT CACCCCTC

961' ACAGGAACTC AAGGACAGAT CAGGTTGAAT TGTAGGGTGG TGAACCTCAA CTCT
    ** ** * * * * * ***** * * * * * ** * * * * * ***** ***
961" ACCGGCACCC AGGGCCAGAT CCGCCTCAAC TGCCGGCTCG TCAACTCAA CTCC
    
```

Fig. 4

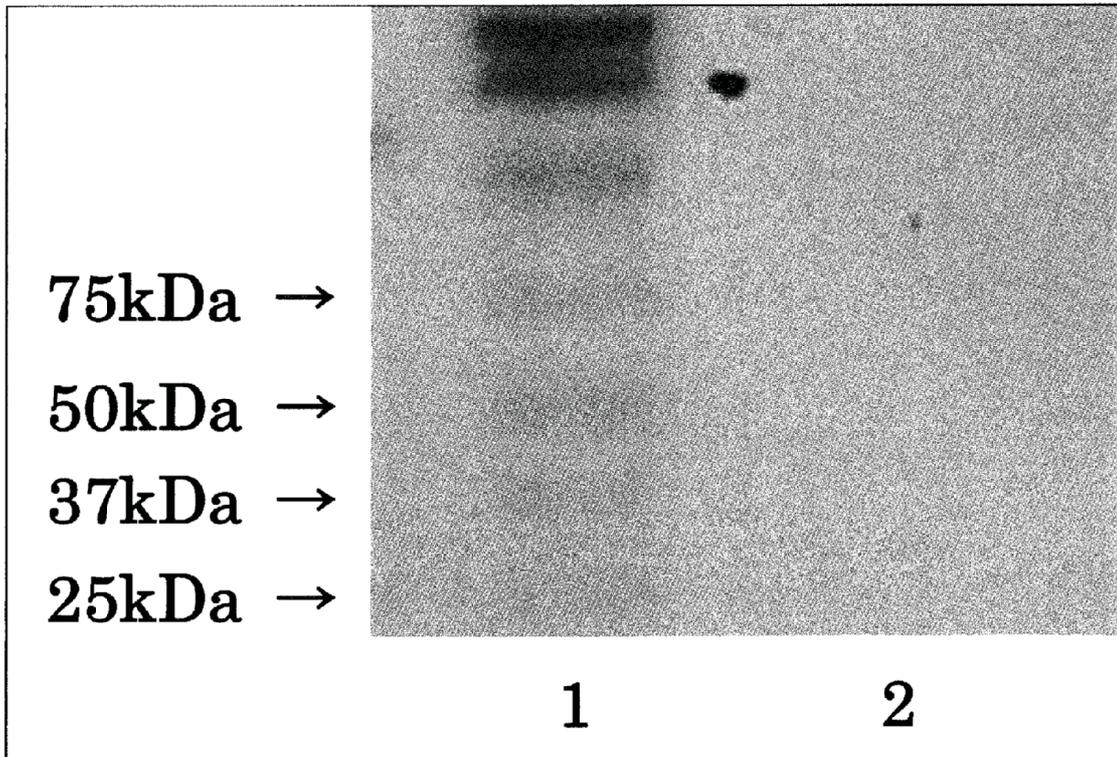


Fig. 5

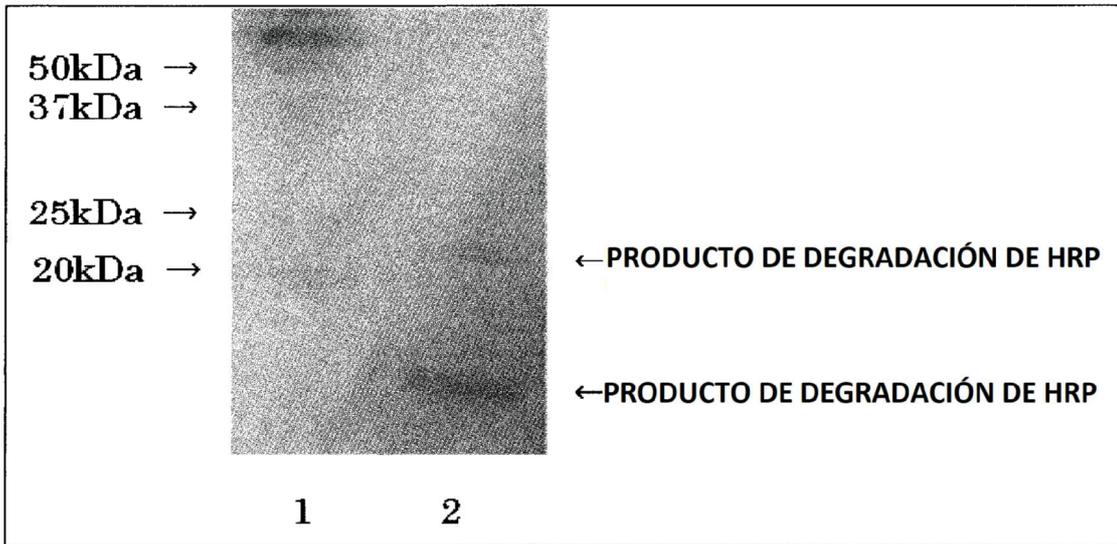


Fig. 6

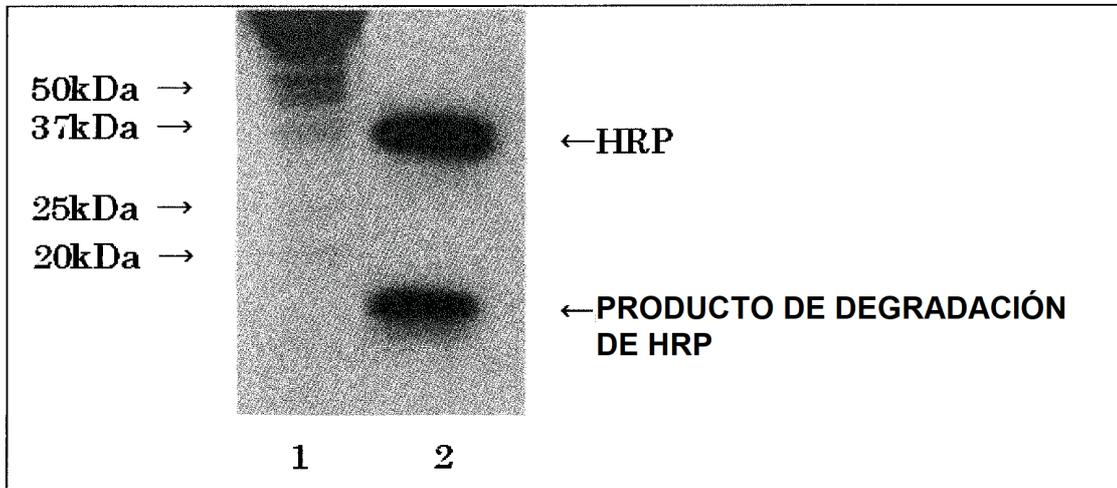


Fig. 7

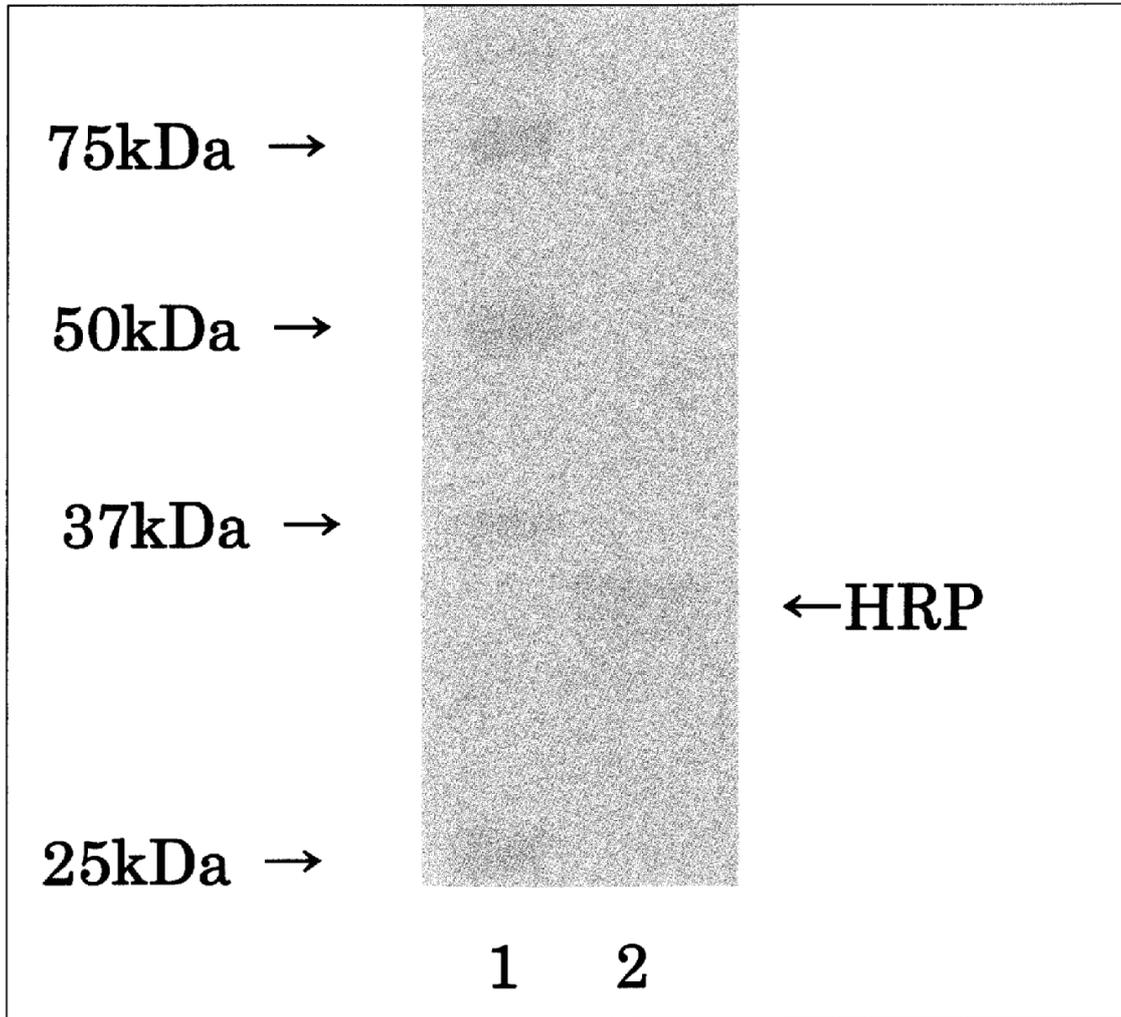


Fig. 8

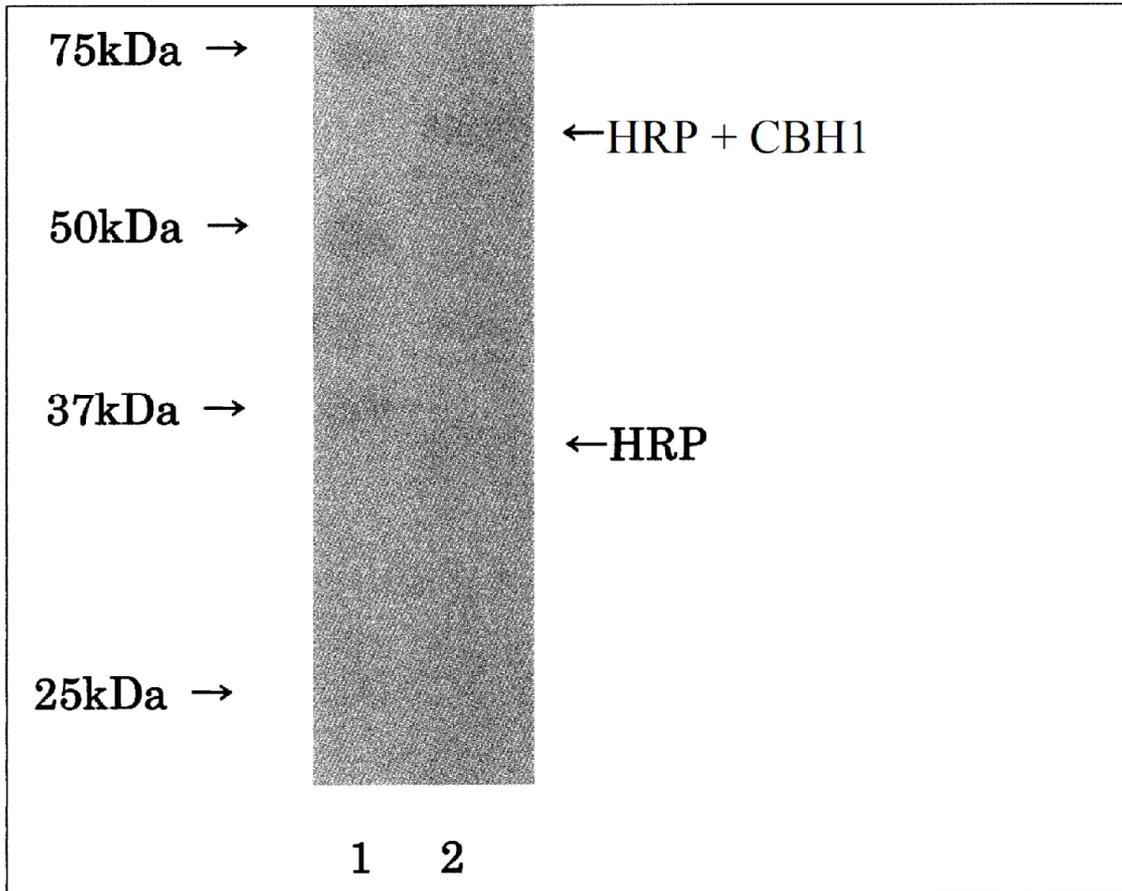


Fig. 9

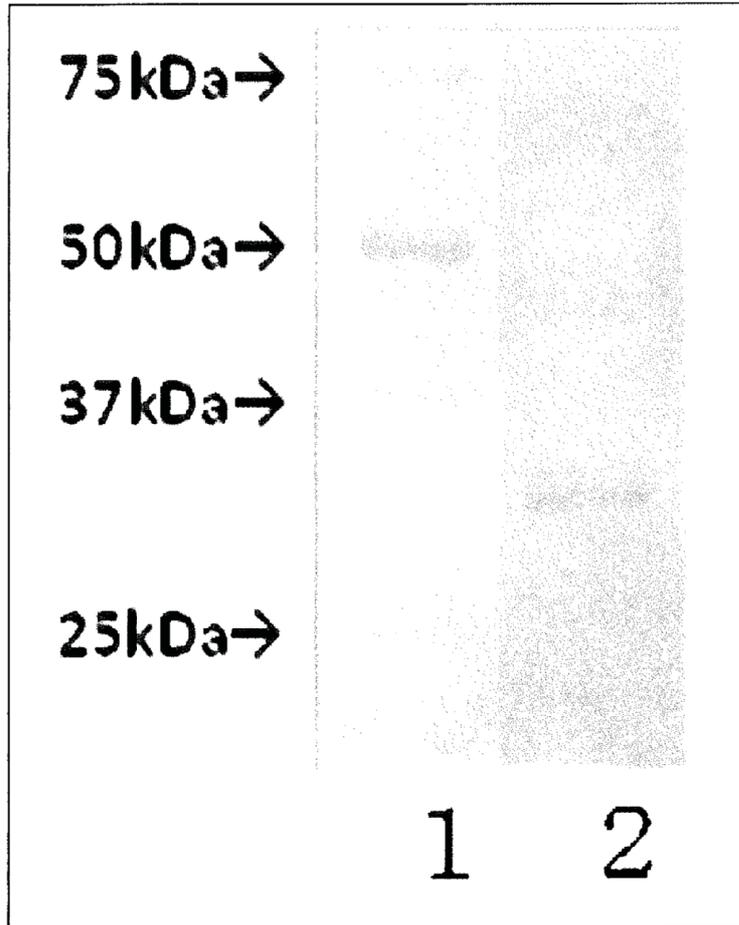


Fig. 10

```

1' ATGCATTTCT CTTCTTCTTC TACTTTGTTC ACTTGTATAA CCTTAATCCC ATTGGTATGT
   ***** ** * ** ** * ** ** ** ** * ** * ***** * ** **
1" ATGCACTTCT CCAGCTCCTC CACCCTCTTC ACGTGCATCA CCCTCATCCC CCTCGTCTGC

61' CTTATTCTTC ATGCTTCTTT GTCTGATGCT CAACTTACCC CTACCTTCTA CGACAATTCA
   ** ** ** * * ***** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
61" CTCATCCTCC ACGCTTCCCT GTCCGACGCC CAGCTGACCC CTACCTTCTA CGACAACTCC

121' TGCCTAATG TCTCTAACAT CGTACGGGAT ACTATTGTCA ATGAGCTAAG ATCAGACCCT
   ** ***** * ***** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
121" TGCCCTAACG TCTCCAACAT CGTCCGGGAC ACCATCGTCA ACGAGCTCCG CTCCGACCCC

181' CGTATTGCCG CGAGCATCCT TCGTCTTAC TTCCACGACT GCTTTGTAA TGTTGTGAC
   ***** ** * ***** ** ** ** ** ***** ** ** * ** ** ** ** **
181" CGTATCGCCG CCAGCATCCT CCGCCTCCAC TTCCACGACT GCTTCGTCAG CGGTTGCGAC

241' GCATCGATCT TGTTAGACAA CACAACATCA TTTCGAACAG AGAAAGATGC GTTTGAAAC
   ** ** ** * * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
241" GCTTCCATCC TCCTCGACAA CACCACCAGC TTCCGCACCG AGAAGGACGC GTTCGGCAAC

301' GCAAACCTCGG CAAGAGGATT TCCAGTGATT GATAGAATGA AAGCCGCGGT GGAGAGTGCA
   ** ***** * * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** * ***** * ***** ** ** **
301" GCCAACTCCG CTCGCGGCTT CCCCGTCATC GACCGCATGA AGGCCGCGGT CGAGTCCGCC

361' TGCCCAAGAA CCGTTTCATG CGCAGATTTG CTCACCATTG CAGCTCAACA ATCTGTCACT
   ***** * * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * **
361" TGCCCTCGCA CCGTCTCCTG CGCCGACCTC CTCACGATCG CCGCCAGCA GTCCGTCAAC

421' TTGGCGGGAG GTCCTTCTTG GAGAGTTCCT TTGGGCAGAA GAGATAGCTT ACAAGCATTT
   * ** ** * * ** ** * * ***** * ** * * ** * * ** ** **
421" CTCGCCGGTG GCCCAGCTG GCGTGTTCCT CTCGGTCGCC GCGACTCCCT CCAGGCTTTC

481' CTGGATCTTG CTAATGCAAA TCTTCCAGCT CCATTCTTCA CACTTCCACA ACTTAAAGAC
   ** ** ** * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * **
481" CTCGACCTCG CCAACGCCAA CCTGCCGCT CCCTTCTTCA CCCTGCCCA GCTCAAGGAC
    
```

Fig. 11

541'	AGCTTTAGAA	ATGTTGGCCT	CAACCGTTCT	TCTGATCTCG	TTGCACTGTC	CGGGGGCCAC
	***	* * *	** *****	***** **	** ** ****	**** ** **
541"	TCCTTCGCA	ACGTCGGCCT	CAACCGCTCC	TCCGACCTCG	TTGCCCTCTC	CGGCGGTCAC
601'	ACATTTGGTA	AAAATCAGTG	TCGGTTTATT	ATGGACAGAT	TATACAACCTT	CAGCAACACC
	** ** *	* ** *****	** ** **	***** *	* ****	***** *
601"	ACCTTCGCA	AGAACCAGTG	CCGCTTCATC	ATGGACCGCC	TCTACAACCTT	CTCCAACACC
661'	GGTTTACCCG	ATCCTACTCT	CAACACTACT	TATCTCCAAA	CTCTTCGTGG	ACTATGTCCC
	** * ****	* ** ** **	***** **	** ** ** *	* ** ** **	** ** **
661"	GGCCTCCCCG	ACCCACCCCT	CAACACCACC	TACCTGCAGA	CCCTCCGCGG	CCTCTGCCCC
721'	CTCAATGGTA	ATCTAAGCGC	TTTGGTGGAT	TTTGATCTAC	GTACGCCAAC	GATTTTTGAC
	***** ** *	* ** ***	* *****	** ** ** *	* ** ** **	** ** **
721"	CTCAACGGCA	ACCTCTCCGC	CCTCGTGGAC	TTCGACCTCC	GCACCCCCAC	CATCTTCGAT
781'	AACAAATACT	ATGTGAATCT	CGAAGAGCAA	AAAGGACTTA	TCCAAAGCGA	CCAAGAGTTG
	***** ** **	* ** ** **	** *****	** ** ** *	**** **	*** ** ** *
781"	AACAAGTACT	ACGTCAACCT	GGAGGAGCAG	AAGGGCCTCA	TCCAGTCCGA	CCAGGAGCTG
841'	TTCTCTAGCC	CCAATGCCAC	TGACACAATC	CCTTTGGTGA	GATCATTTCG	TAATAGCACA
	***** **	**** *****	***** **	** ****	* ** ** **	** ** *
841"	TTCTCCTCCC	CCAACGCCAC	CGACACGATC	CCCCTGGTCC	GCTCCTTCGC	CAACTCCACC
901'	CAAACATTCT	TCAATGCATT	TGTGGAGGCG	ATGGATAGGA	TGGGAAACAT	TACACCTCTT
	** ** ****	**** ** **	** *****	***** *	**** *****	** ** **
901"	CAGACGTTCT	TCAACGCCTT	CGTCGAGGCC	ATGGACCGCA	TGGGCAACAT	CACCCCTCTC
961'	ACAGGAACTC	AAGGACAGAT	CAGGTTGAAT	TGTAGGTTGG	TGAACTCCAA	CTCT
	** ** ** *	* ** *****	* * **	** * ** *	* ****	***
961"	ACCGGCACCC	AGGGCCAGAT	CCGCCTCAAC	TGCCGCGTCC	TCAACTCCAA	CTCC

Fig. 12

1'	ATGCACTTCT	CCAGCTCCTC	CACCCTCTTC	ACGTGCATCA	CCCTCATCCC	CCTCGTCTGC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
1"	ATGCACTTCT	CCAGCTCCTC	CACCCTCTTC	ACGTGCATCA	CCCTCATCCC	CCTCGTCTGC
61'	CTCATCTCC	ACGCTTCCCT	GTCCGACGCC	CAGCTCACCC	CTACCTTCTA	CGACAACTCC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
61"	CTCATCTCC	ACGCTTCCCT	GTCCGACGCC	CAGCTGACCC	CTACCTTCTA	CGACAACTCC
121'	TGCCCTAACG	TCAGCAACAT	CGTCCGCGAC	ACCATCGTCA	ACGAGCTGCG	CTCCGACCCC
	*****	** *****	*****	*****	*****	*****
121"	TGCCCTAACG	TCTCCAACAT	CGTCCGCGAC	ACCATCGTCA	ACGAGCTCCG	CTCCGACCCC
181'	CGTATCGCCG	CCTCCATCCT	CCGCCTCCAC	TTCCACGACT	GCTTCGTCAA	CGGTTGCGAC
	*****	** *****	*****	*****	*****	*****
181"	CGTATCGCCG	CCAGCATCCT	CCGCCTCCAC	TTCCACGACT	GCTTCGTCAA	CGGTTGCGAC
241'	GTTCCATCC	TCCTCGACAA	CACCACCAGC	TTCCGCACCG	AGAAGGACGC	CTTCGGCAAC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
241"	GTTCCATCC	TCCTCGACAA	CACCACCAGC	TTCCGCACCG	AGAAGGACGC	CTTCGGCAAC
301'	GCCAACTCCG	CTCGCGGCTT	CCCCGTCATC	GACCGCATGA	AGGCCGCCGT	CGAGTCCGCC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
301"	GCCAACTCCG	CTCGCGGCTT	CCCCGTCATC	GACCGCATGA	AGGCCGCCGT	CGAGTCCGCC
361'	TGCCCTCGCA	CCGTCAGCTG	CGCCGACCTC	CTCAGGATCG	CCGCCAGCA	GTCCGTCACC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
361"	TGCCCTCGCA	CCGTCTCCTG	CGCCGACCTC	CTCAGGATCG	CCGCCAGCA	GTCCGTCACC
421'	CTCGCCGGTG	GCCCCTCCTG	GGTGTTCCT	CTCGGTCGCC	GCGACTCCCT	CCAGGCTTTC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
421"	CTCGCCGGTG	GCCCCAGCTG	GGTGTTCCT	CTCGGTCGCC	GCGACTCCCT	CCAGGCTTTC
481'	CTCGACCTCG	CCAACGCCAA	CCTGCCCGCT	CCCTTCTTCA	CCCTGCCCCA	GCTCAAGGAC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
481"	CTCGACCTCG	CCAACGCCAA	CCTGCCCGCT	CCCTTCTTCA	CCCTGCCCCA	GCTCAAGGAC

Fig. 13

541'	TCCTFCGGCA	ACGTCGGCCT	CAACCGCTCC	TCCGACCTCG	TTGCCCTCTC	CGGCGGTCAC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
541"	TCCTFCGGCA	ACGTCGGCCT	CAACCGCTCC	TCCGACCTCG	TTGCCCTCTC	CGGCGGTCAC
601'	ACCTFCGGCA	AGAACCAGTG	CCGCTTCATC	ATGGACCGCC	TCTACAACCT	CTCCAACACC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
601"	ACCTFCGGCA	AGAACCAGTG	CCGCTTCATC	ATGGACCGCC	TCTACAACCT	CTCCAACACC
661'	GGCCTCCCGG	ACCCACCCCT	CAACACCACC	TACCTGCAGA	CCCTCCGGGG	CCTCTGCCCC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
661"	GGCCTCCCGG	ACCCACCCCT	CAACACCACC	TACCTGCAGA	CCCTCCGGGG	CCTCTGCCCC
721'	CTCAACGGCA	ACCTCTCCGC	CCTCGTGGAC	TTCGACCTCC	GCACCCCCAC	CATCTTCGAT
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
721"	CTCAACGGCA	ACCTCTCCGC	CCTCGTGGAC	TTCGACCTCC	GCACCCCCAC	CATCTTCGAT
781'	AACAAGTACT	ACGTCAACCT	GGAGGAGCAG	AAGGGCCTCA	TCCAGTCCGA	CCAGGAGCTG
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
781"	AACAAGTACT	ACGTCAACCT	GGAGGAGCAG	AAGGGCCTCA	TCCAGTCCGA	CCAGGAGCTG
841'	TTCTCCTCCC	CCAACGCCAC	CGACACGATC	CCCCTGGTCC	GCTCCTTCGC	CAACTCCACC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
841"	TTCTCCTCCC	CCAACGCCAC	CGACACGATC	CCCCTGGTCC	GCTCCTTCGC	CAACTCCACC
901'	CAGACGTTCT	TCAACGCCTT	CGTCGAGGCC	ATGGACCGCA	TGGGCAACAT	CACCCCCCTC
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
901"	CAGACGTTCT	TCAACGCCTT	CGTCGAGGCC	ATGGACCGCA	TGGGCAACAT	CACCCCCCTC
961'	ACCGGCACCC	AGGGCCAGAT	CCGCCTCAAC	TGCCGCGTCG	TCAACTCCAA	CTCCTAG
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
961"	ACCGGCACCC	AGGGCCAGAT	CCGCCTCAAC	TGCCGCGTCG	TCAACTCCAA	CTCCTAG

Fig. 14

