

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 743**

51 Int. Cl.:

C12P 17/14	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)
C12N 15/80	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)
C07K 11/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/EP2015/055978**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140315**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15716435 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 3119900**

54 Título: **Procedimiento de obtención de péptidos no ribosómicos mediante expresión heteróloga de al menos una sintetasa de péptido no ribosómico en Aspergillus niger**

30 Prioridad:

20.03.2014 EP 14160821

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.09.2018

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)
Strasse des 17. Juni 135
10623 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**BOECKER, SIMON;
STORM, DIRK;
MEYER, VERA;
RICHTER, LENNART;
ZOBEL, SOPHIA;
WANKA, FRANZISKA;
SÜSSMUTH, RODERICH y
MÜHLENWEG, AGNES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 682 743 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

Procedimiento de obtención de péptidos no ribosómicos mediante expresión heteróloga de al menos una sintetasa de péptido no ribosómico en *Aspergillus niger*

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener al menos un péptido no ribosómico, o uno marcado isotópicamente, comprendiendo el procedimiento:

la etapa de expresión heteróloga de al menos una sintetasa de un péptido no ribosómico (NRPS) de dicho péptido no ribosómico en el hongo filamentosos *Aspergillus niger*,
 en el que la NRP sintetasa es una ciclodepsipéptido sintetasa seleccionada de entre el grupo que contiene Enniatin, PF1022, Beauvericin y Bassianolide sintetasa,
 10 en el que se utiliza un sistema de expresión inducible integrado en el genoma del hongo filamentosos *Aspergillus niger* para la expresión heteróloga de al menos una sintetasa,
 en el que el sistema de expresión comprende al menos un casete de expresión que comprende un primer módulo para la expresión constitutiva del transactivador rTA2 dependiente de tetraciclina,
 un segundo módulo que alberga el promotor dependiente de rTA2 para la expresión inducible de al menos una
 15 sintasa de un metabolito secundario y un tercer módulo para la integración del casete en el genoma fúngico por recombinación homóloga o heteróloga utilizando los marcadores genéticos apropiados.

Descripción

20 Los recientes esfuerzos de búsqueda en el genoma han descubierto que los genomas de hongos filamentosos codifican un repertorio inesperadamente rico en compuestos de bajo peso molecular de relevancia comercial. Estos productos naturales conocidos como metabolitos secundarios incluyen péptidos no ribosómicos, poliquétidos y lipopéptidos con impacto farmacológico. Sin embargo, la mayoría de los genes implicados en las rutas metabólicas secundarias no se expresan en condiciones convencionales de laboratorio o industriales, lo que impide la aplicación de estos productos naturales. se han emprendido diferentes estrategias basadas en factores moleculares y procedimientos de cultivo. Sin embargo, hay aún obstáculos grandes para superarlo tal como las bajas tasas de producción.

El documento de patente EP 1 215 281 A1 desvela un procedimiento para obtener al menos un péptido no ribosómico que comprende:

30 la etapa de expresión heteróloga de al menos una sintetasa de péptido no ribosómico (NRPS) de dicho péptido no ribosómico en el hongo filamentosos *Mycelia sterilia*,
 en el que la NRPS es la ciclodepsipéptido sintetasa PF100 sintetasa,
 en el que se utiliza un sistema de expresión no integrado, no inducible para la expresión heteróloga de la PF1022 sintetasa.

35 El documento MEYER, V. Y COL.: "Fungal Gene Expression on Demand: An Inducible, Tunable, and Metabolism-Independent Expression System for *Aspergillus niger*" (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 77, nº 9, May 2011, páginas 2975-2983) desvela un sistema de expresión integrado e inducible para *Aspergillus niger* que comprende un casete de expresión que comprende un primer módulo para la expresión constitutiva del transactivador rTA2 dependiente de tetraciclina, un segundo módulo que alberga el promotor dependiente de rTA2 para la expresión inducible de al menos un polipéptido y un tercer módulo para la integración del casete en el
 40 genoma fúngico por recombinación homóloga o heteróloga utilizando los marcadores genéticos apropiados. Este sistema de expresión se describe como una herramienta útil para la sobreproducción proteica en *Aspergillus niger*.

La presente invención describe de esta manera una nueva estrategia para la síntesis de péptidos no ribosómicos, en particular ciclodepsipéptidos.

45 La presente invención comprende la etapa de expresión heteróloga de al menos una sintetasa de péptido no ribosómico (NRPS). El hongo filamentosos es *Aspergillus niger*. La ciclodepsipéptido sintetasa es en particular una ciclodepsipéptido sintetasa del tipo iterativo. La ciclodepsipéptido sintetasa se selecciona de entre el grupo de Enniatin, PF1022, Beauvericin y Bassianolide sintetasa.

En general también es posible y concebible expresar NRPS adicionalmente en uno de los hongos mencionados, tales como una NRPS de epotilona, actinomicina, daptomicina, valinomicina, fungisporina o bleomicina.

50 La ciclodepsipéptido sintetasa nativa normalmente comprende dos módulos: el módulo para la integración de un ácido D-hidroxicarboxílico, el módulo 2 para la integración de un L-aminoácido y adicionalmente un tercer PCP y dominio C (módulo 3) para la determinación del tamaño del anillo n, normalmente n = 6 y 8. Un ejemplo típico de una ciclodepsipéptido sintetasa, tal como la Enniatin sintetasa se muestra en la Figura 1.

55 La Enniatin es un hexaciclodepsipéptido que consiste en 3 ácidos D-hidroxicarboxílicos y 3 L-aminoácidos. Los principales productos son la Enniatin A, B y C, comprendiendo la Enniatin A 3x D-Hiv, 3x L-Ile, comprendiendo la

Enniatin B 3x D-Hiv, 3x L-Val y comprendiendo la Enniatin C 3x D-Hiv, 3x L-Leu. El átomo N está metilado en cada caso.

5 La Enniatin se sintetiza por una Enniatin sintetasa que está presente en *Fusarium sp.*, *Verticillium hempterigenum*, *Halosarpheria sp.* En el caso del módulo 1 de la Enniatin B es específico para D-hidroxicvalerato, el módulo 2 es específico para L-valina y PCP/dominio C (módulo 3) determinando el número de anillo n = 6.

La PF1022 sintetasa, que es en el momento presente en *Mycelia sterilia*, comprende un módulo 1 específico para D-fenil-lactato y/o D-lactato, un módulo 2 específico para L-leucina y un PCP/dominio C (módulo 3) que determina un número de anillo n = 8.

10 La Beauvericin sintetasa, por ejemplo, de la cepa ATCC₇₁₅₉ de *Beauveria bassiana*, comprende un módulo 1 específico de D-hidroxicvalerato, un módulo 2 específico para L-fenilalanina y un PCT/dominio C (módulo 3) que determina que el número de anillo sea n = 6.

15 En otra realización preferida se utiliza una ciclodepsipéptido sintetasa quimérica, en la que la sintetasa está fabricada de módulos y/o dominios de al menos dos ciclodepsipéptido sintetasa. Se prefiere que se escoja al menos un módulo de entre una primera ciclodepsipéptido sintetasa y se escoja al menos un segundo módulo de otra ciclodepsipéptido sintetasa. Por ejemplo, es posible que la sintetasa comprenda un módulo de una ciclodepsipéptido sintetasa y el módulo 2 y 3 de otra ciclodepsipéptido sintetasa.

Las realizaciones preferidas de dichas ciclodepsipéptido sintetasa híbridas o quiméricas pueden tener las siguientes disposiciones:

- 20 a) un módulo 1 de la PF1022 sintetasa específica para el D-fenil-lactato/D-lactato (por ejemplo, de *Mycelia sterilia*), un módulo 2 y PCP/dominio C (módulo 3) de Enniatin sintetasa específica para L-valina y n = 6 (por ejemplo, de *Fusarium oxysporum*; véase la Figura 14, SEQ ID NO: 1), o
 b) un módulo 1 de PF1022 sintetasa específica para D-fenil-lactato/D-lactato, un módulo 2 y PCR/dominio C (módulo 3) de Beauvericin Sintetasa específica para L-Fenilalanina y n = 6 (véase la Figura 16, SEQ ID NO: 2).

25 En general, es posible cualquier otra combinación de módulo/dominio. Por ejemplo, se puede concebir y es posible que el módulo 1 se escoja de una Enniatin o Beauvericin sintetasa y el módulo 2 y PCP/dominio C (módulo 3) se escogen de la PF1022 sintetasa.

30 Sin embargo, ya se conoce un sistema de ciclodepsipéptido sintetasa híbrida comprende un módulo 1 de Beauvericin sintetasa y el módulo 2 y PCP/dominio C (módulo 3) de Bassianolide sintetasa como sistema de sintetasa, que se ha demostrado que se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*, y por lo tanto está exento (Yu y col., ChemComm., 2013, 49:6176-6178). Esta ciclodepsipéptido sintetasa quimérica específica no está, sin embargo, exenta de expresión en hongos filamentosos. Se utiliza un sistema de expresión inducible integrado en el cromosoma de *Aspergillus niger* para la expresión heteróloga de al menos una ciclodepsipéptido. Dicho sistema de expresión inducible es independiente del metabolismo. El sistema de expresión comprende al menos un casete de expresión que consiste en al menos tres módulos. El casete de expresión puede comprender un primer módulo para la expresión constitutiva del transactivador rtTA2 dependiente de tetraciclina, un segundo módulo (sistema Tet-on) que alberga el promotor dependiente de rtTA2 para la expresión inducible de al menos una metabolito sintetasa secundaria y un tercer módulo para integrar el casete en el genoma fúngico por recombinación homóloga.

35 En una realización más preferida el primer módulo comprende el promotor constitutivo PgpdA – rtTA – terminador TcgrA, el segundo módulo comprende la secuencia operadora tetO7 – (siete copias de la secuencia tetO) – el promotor mínimo Pmin – terminador trpC de la metabolito sintasa (esyn1) secundaria (con tetO7::Pmin como promotor dependiente de rtTA2S-M2) y el tercer módulo comprende pyrG* para la integración del plásmido en el locus pyrG. Después de la transformación del vector plasmídico que comprende dicho casete de expresión en un negativo proteasa (prtT) preferible y auxótrofo a uracilo (pyrG⁻) se seleccionó una cepa de *A. niger* de transformantes protótrofos de uridina, se purificaron y se sometieron a análisis de Southern. El casete de expresión se muestra ejemplarmente en la Figura 2.

40 Al menos una copia del casete de expresión se integra en el genoma fúngico. Es posible que estén presentes en el genoma fúngico múltiples casetes de expresión.

45 En otra variante de la presente invención el casete de expresión comprende enes adicionales que codifican enzimas biosintéticas de precursores metabólicos o intermediarios metabólicos, en particular deshidrogenasas. Por ejemplo, utilizando deshidrogenasas para la transformación de aminoácidos en ácidos hidroxicarboxílicos, que se expresan constitutivamente, que permite una síntesis independiente de diferentes ácidos hidroxicarboxílicos.

Dichos genes adicionales puede que tampoco sean parte del casete de expresión y se pueden expresar desde diferentes localizaciones cromosómicas utilizando al menos un promotor constitutivo, inducible o represible.

55 El huésped de expresión *Aspergillus niger* transformado se cultiva en un medio de cultivo adecuado. El medio de cultivo que se utiliza para la expresión heteróloga de la sintetasa puede comprender partículas de talco, titanio, sílice

u óxido de aluminio, entre los que se prefieren las partículas de talco. Estas partículas soportan la formación de pequeños aglomerados fúngicos.

5 El medio de cultivo comprende, además, glucosa, elementos traza, aminoácidos, MgSO₄, extractos de levadura. En una variante del presente procedimiento la concentración de glucosa es del 1-10 %, preferentemente del 2,5 al 7,5 %, más preferentemente del 5 %.

También que el medio de cultivo utilizado para la expresión heteróloga de la ciclodepsipéptido comprende 5-50 mM, preferentemente 10-30 mM, más preferentemente 20 mM de al menos un ácido hidroxicarboxílico (por ejemplo 20 mM de D-hidroxicarboxílico) y 10-30 mM, preferentemente 15-25 mM, más preferentemente 20 mM de al menos un aminoácido (por ejemplo, L-valina).

10 También es posible en general también es posible remplazar el ácido hidroxicarboxílico por sus ésteres correspondientes, por ácidos hidroxicarboxílicos O-acilados y sus ésteres correspondientes. Por esto, se prefieren los metil ésteres.

15 La inducción de la expresión se produce añadiendo el inductor apropiado, por ejemplo, 5-200 µg/ml, en particular 10-100 µg/ml, más preferentemente 10-50 µg/ml de doxiciclina u otros inductores tales como la tetraciclina o derivados de la misma. Se prefiere en particular la adición de 10 µg/ml de doxiciclina. La inducción se lleva a cabo preferentemente en la fase exponencial, en particular en cultivo discontinuo o semi-continuo. El inductor se puede añadir una vez o repetidamente.

20 En una realización adicional de la presente invención el medio de cultivo que se utiliza para la expresión heteróloga de la ciclodepsipéptido sintetasa comprende al menos un ácido D- o L-hidroxicarboxílico (o una mezcla racémica de los mismos) de fórmula general (I) R¹-CHOH-CO₂H, en el que R¹ se selecciona de entre un grupo que comprende

- un C₁-C₅₀-alquilo sustituido y no sustituido, un C₂-C₅₀-alqueno sustituido y no sustituido, un C₂-C₅₀-alquino sustituido o no sustituido, un C₃-C₁₀-cicloalquilo sustituido y no sustituido, un C₅-C₇-cicloalqueno sustituido o no sustituido, que en cada caso puede estar interrumpido por uno o más átomos de oxígeno, átomos de azufre, átomos de nitrógeno sustituidos o mono-sustituidos, dobles enlaces y/o por uno o más grupos del tipo -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH- y/o -OC(O)O-, o
- 25 - un arilo, heteroarilo, -CH₂-arilo, o -CH₂-heteroarilo, en los que el arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos.

30 Por lo tanto, se pueden añadir los ácidos hidroxicarboxílicos al medio de cultivo durante el crecimiento del huésped de expresión. Sin embargo, también es posible que al menos uno de los ácidos hidroxicarboxílicos se sintetice por el propio huésped de expresión.

El resto R¹ se puede seleccionar de entre un grupo que comprende C₁-C₁₂-alquilo sustituidos o no sustituido, C₃-C₇-cicloalquilo sustituido y no sustituido y C₂-C₁₂-alqueno sustituido y no sustituido y un C₆-C₁₂-arilo sustituido y no sustituido, en particular -C₆-H₅.

35 El término "sustituido" en conexión con alquilo, alqueno, alquino, cicloalqueno se refiere a la sustitución de uno o más átomos, habitualmente átomos de H, por uno o más de los siguientes sustituyentes: un halógeno, en particular, F, Cl, Br, hidroxilo, hidroxilo protegido, oxo, oxo protegido, -N₃, C₃-C₇ cicloalquilo, fenilo, naftilo, amino, amino protegido, amino primario, secundario o terciario, un anillo heterocíclico, imidazolilo, indolilo, pirrolidinilo, C₁-C₁₂-alcoxilo, C₁-C₁₂-acilo, C₁-C₁₂-aciloxi, nitro, carboxi, carbamilo, carboxamido, N-(C₁-C₁₂-alquilo) carboxamido, N,N-Di(C₁-C₁₂-alquilo) carboxamido, ciano, metil-sulfonilamino, tiol, C₁-C₁₀-alquiltio y C₁-C₁₀-alquilsulfonilo. Los grupos sustituidos pueden sustituirse una vez o dos veces con el mismo o diferentes sustituyentes.

40 Ejemplos para los grupos alquilo sustituidos anteriores comprenden 2-oxo-prop-1-ilo, 3-oxo-but-1-ilo, cianometilo, nitrometilo, clorometilo, hidroximetilo, tetrahidropiraniioximetilo, trietiloximetilo, propioniloximetilo, aminometilo, carboximetilo, aliloxicarbonilaminometilo, aliloxicarbonilaminometilo, metoximetilo, etoximetilo, t-butoximetilo, acetoximetilo, clorometilo, bromometilo, yodometilo, trifluorometilo, 6-hidroxihexilo, 2,4-dicloro(n-butilo), 2-aminopropilo, 1-cloretilo, 2-cloretilo, 1-bromoetilo, 2-bromoetilo, 1-fluoroetilo, 2-fluoroetilo, 1-yodoetilo, 2-yodoetilo, 1-cloropropilo, 2-cloropropilo, 3-cloropropilo, 1-bromopropilo, 2-bromopropilo, 3-bromopropilo, 1-fluoropropilo, 2-fluoropropilo, 3-fluoropropilo, 1-yodopropilo, 2-yodopropilo, 3-yodopropilo, 2-aminoetilo, 1-aminoetilo, N-benzoilo-2-aminoetilo, N-acetilo-2-aminoetilo, N-benzoilo-1-aminoetilo, N-acetilo-1-aminoetilo y similares.

50 Ejemplos de los grupos alqueno sustituidos anteriores comprenden estiroilo, 3-cloro-propen-1-ilo, 3-cloro-buten-1-ilo, 3-metoxi-propen-2-ilo, 3-fenilo-buten-2-ilo, 1-ciano-buten-3-ilo y similares.

El término "alquino" como se utiliza en el presente documento se refiere a un resto de fórmula R-C≡C-, en particular a un "C₂-C₅₀-Alquino". Ejemplos de un C₂-C₅₀-alquino comprenden etinilo, propinilo, 2-butinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo, 2-heptinilo, 3-heptinilo, 4-heptinilo, 5-heptinilo, octinilo, noninilo, decinilo, undecinilo, dodecinilo, así como di- y tri-inas de cadenas de alquilo lineales o ramificadas.

55

El término "oxo" se refiere a un átomo de carbono, que está conectado con un átomo de oxígeno mediante un doble enlace formando de esta manera un grupo ceto o aldehído. El término "oxo protegido" se refiere a un átomo de carbono, que está sustituido por dos grupos alcoxi o está conectado dos veces con un diol sustituidos que forma un grupo cetal no cíclico o cíclico.

5 El término "alcoxi" se refiere a restos como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi y similares. Un grupo alcoxi preferido es metoxi.

El término "C₃-C₇-cicloalquilo" comprende grupos como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. El término "C₅-C₇-cicloalqueno" se refiere a un anillo 1,2 o 3-ciclopentenilo, un anillo 1, 2, 3, o 4-ciclohexinilo, o un anillo 1, 2, 3, 4 o 5-cicloheptenilo.

10 Preferentemente R¹ es un metilo, etilo, -CH(CH₃)₂, propilo, isopropilo, -CH₂-CH(CH₃)₂, butilo, isobutilo, tert-butilo, -CH₂-C(CH₃)₃, pentilo, hexilo, -CH₂-C₆H₅ -CH₂-Cl, -CH₂-Br, -CH₂-F, -CH₂-I, -CH₂-N₃, -CH₂-C≡CH, -CH₂CH=CH₂CH₃ o -CH₂-cicloC₃H₅.

15 En otra realización preferida de la presente invención el medio de cultivo utilizado para la expresión heteróloga de la ciclodepsipéptido sintetasa comprende la menos un D- o L-aminoácido de fórmula general (II) R²-CHNH₂-CO₂H, en la que R² se selecciona de entre el grupo que comprende

20 - C₁-C₅₀-alquilo sustituido o no sustituido, C₂-C₅₀-alqueno sustituido o no sustituido, C₂-C₅₀-alquino sustituido o no sustituido, C₃-C₁₀-cicloalquilo sustituido o no sustituido, C₅-C₇-cicloalqueno sustituido o no sustituido, que en cada caso pueden interrumpirse por uno o más átomos de oxígeno, átomos de azufre, átomos de nitrógeno sustituidos o mono-sustituidos, dobles enlaces y/o por uno o más de los grupos del tipo -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH- y/o -OC(O)O-. En particular R² es -CH₂-C₆H₅ (fenilo), -CH₂-CH(CH₃)₂, -CH₂(CH₃)₂.

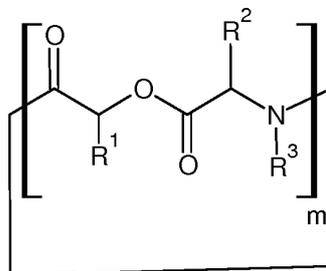
25 Por lo tanto, el aminoácido se puede añadir al medio de cultivo durante el crecimiento del huésped de expresión. La alimentación de un aminoácido al medio de cultivo tiene solo un carácter de soporte y mejora el rendimiento total de expresión. Sin embargo, también es posible (y común) que al menos uno de los aminoácidos, preferentemente los aminoácidos de origen natural son sintetizados por el propio huésped de expresión.

Antes de la transformación en el huésped de expresión, el casete de expresión es parte de un vector plasmídico.

30 Un ejemplo de dicho vector plasmídico comprende un casete de expresión con una Enniatin sintetasa se muestra en la Figura 3. En este vector plasmídico el gen Esyn (Enniatin sintetasa) estaba clonada en el vector de expresión Tet-On pVG2.2. Debido que el gen es grande (9,4 kb) la clonación se llevó a cabo por el procedimiento de recombinación SLIC y homólogo utilizando pyrG como marcador genético. Sin embargo, también son aplicables otras técnicas de clonación adecuadas.

35 El proceso de integración del casete de expresión en el cromosoma de los hongos, tales como *A. niger* se muestra ejemplarmente en la Figura 4. La integración en el genoma puede ser por recombinación homóloga o heteróloga resultando de esta manera en transformantes que albergan integración de una o múltiples copias del casete de expresión.

El presente procedimiento permite la síntesis de al menos un ciclodepsipéptido que comprende la siguiente fórmula general (III)



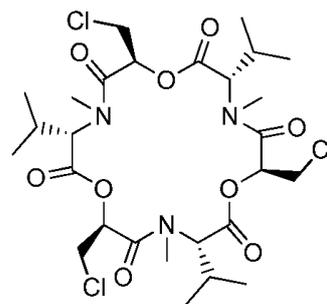
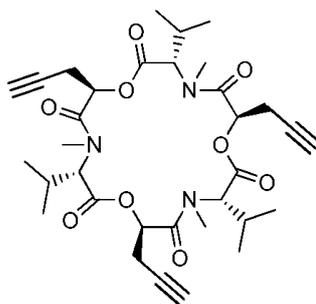
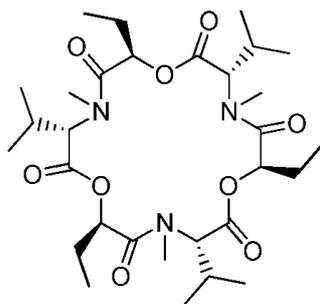
40 en la que R¹ y R² tiene los siguientes significados, R³ es un resto C₁-C₃ alquilo, en particular un resto -CH₃ y m = 3 o 4. Los ciclodepsipéptidos preferidos se muestran en la Figura 10. En la Figura 11, se muestran los datos analíticos de CloroEnniatin obtenidos por adición de clorolactato.

Las variantes preferidas son

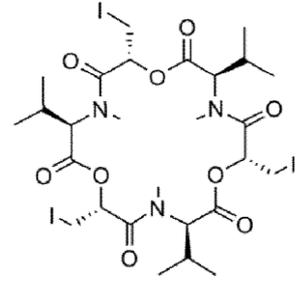
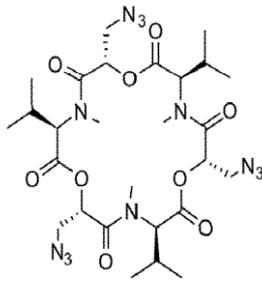
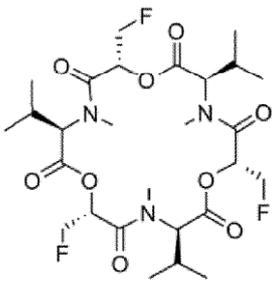
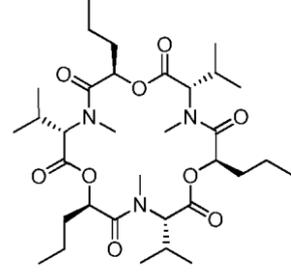
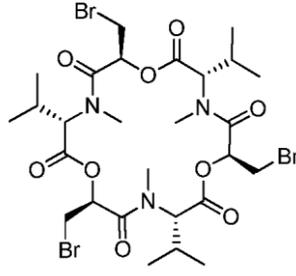
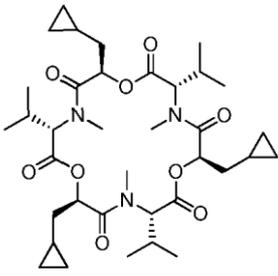
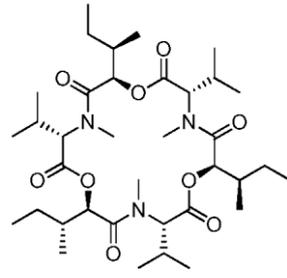
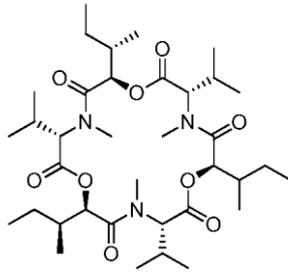
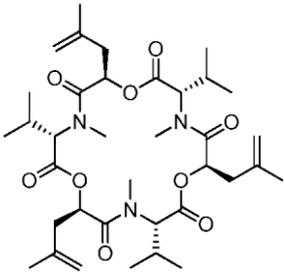
45 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-) ([3Cl-Lac]₃ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-)([3 C-Lac]₂ [Lac]₁ Enniatin

- B)
- Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([3 Cl - Lac]₁ [Lac]₂ Enniatin B)
 - Ciclo(-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-) ([3 Cl - Lac]₃ Enniatin B 2)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil)([3Br-Lac]₂ [Lac]₁ Enniatin B)
 - 5 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([3 Br-Lac]₂ [Lac]₁ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([3 Br - Lac]₁ [Lac]₂ Enniatin B)
 - 10 - Ciclo(-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-) ([3 Br - Lac]₃ Enniatin B 2)
 - Ciclo(-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-2-hidroxiisovaleril-) ([3 Br-Lac]₂ [D-Hiv]₁ Enniatin B)
 - Ciclo(-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-2-hidroxi-lactil-N-metil-L-valil-D-2-hidroxi-isovaleril-) ([3 Br-Lac]₁ [D-Hiv]₂ Enniatin B)
 - 15 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-azidolactil-N-metil-L-valil-D-3-azidolactil-N-metil-L-valil-D-3-azidolactil-) ([3 N₃-Lac]₃ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-azidolactil-N-metil-L-valil-D-3-azidolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([3 N₃-Lac]₂ [Lac]₁ Enniatin)
 - 20 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-fluorolactil-N-metil-L-valil-D-3-fluorolactil-N-metil-L-valil-D-3-fluorolactil-) ([3 F-Lac]₃ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-fluorolactil-N-metil-L-valil-D-3-fluorolactil-N-metil-L-valil-D-3-fluorolactil-) ([3 F-Lac]₂ [Lac]₁ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-yodolactil-N-metil-L-valil-D-3-yodolactil-N-metil-L-valil-D-3-yodolactil-) ([3 I-Lac]₃ Enniatin B)
 - 25 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-yodolactil-N-metil-L-valil-D-3-yodolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([3 I-Lac]₂ [Lac]₁ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-yodolactil-N-metil-L-valil-D-lactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([3 I-Lac]₁ [Lac]₂ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-ciclopropilactil-N-metil-L-valil-D-3-ciclopropilactil-N-metil-L-valil-D-3-ciclo-propilactil-) ([3 Cp-Lac]₃ Enniatin B)
 - 30 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-) ([3 Br-Lac]₁ [3 Cl Lac]₂ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-) ([3 Br-Lac]₂ [3 Cl Lac]₁ Enniatin B)
 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-propagilactat-N-metil-L-valil-D-propagilactat-N-metil-L-valil-D-propagilactil-) ([3 Pr-Lac]₃ Enniatin B)
 - 35 - Ciclo(-N-metil-L-valil-D-3-bromolactil-N-metil-L-valil-D-3-clorolactil-N-metil-L-valil-D-3-lactil-) ([3 Br-Lac]₁ [3 Cl Lac]₁ [Lac]₁ Enniatin B)
 - Ciclo(-L-valil-d6-D-2-hidroxi-isovaleril-N-metil-L-valil-d6-D-2-hidroxi-isovaleril-N-metil-L-valil-de-D-2-hidroxiisovaleril-) (d₁₈ Enniatin B)
 - 40 - Ciclo (-N-metil-L-fenilalanil-D-fenilactil-N-metil-L-fenilalanil-D-fenilactil-N-metil-L-fenilalanil-D-fenilactil-) ([PheLac]₃ Beauvericin)
 - Ciclo (-N-metil-L-valil-D-fenilactil-N-metil-L-valil-D-fenilactil-N-metil-L-valil-D-fenilactil-) ([PheLac]₃ Enniatin B)
 - Ciclo (-N-metil-L-valil-D-fenilactil-N-metil-L-valil-D-fenilactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([PheLac]₂ [Lac]₁ Enniatin B)
 - Ciclo (-N-metil-L-valil-D-lactil-N-metil-L-valil-D-lactil-N-metil-L-valil-lactil-) ([Lac]₃ Enniatin B)
 - 45 - Ciclo (-N-metil-L-D-valil-D-fenilalanil-N-metil-L-valil-D-lactil-N-metil-L-valil-D-lactil-) ([PheLac]₁ [Lac]₂ Enniatin B)
 - Ciclo (-N-metil-L-fenilalanil-D-fenilactil-N-metil-L-fenilalanil-D-fenilactil-N-metil-L-fenilalanil-D-lactil-) ([PheLac]₂ [Lac]₁ Beauvericin)

Las estructuras químicas de algunas de las anteriores y variantes adicionales se muestran posteriormente:

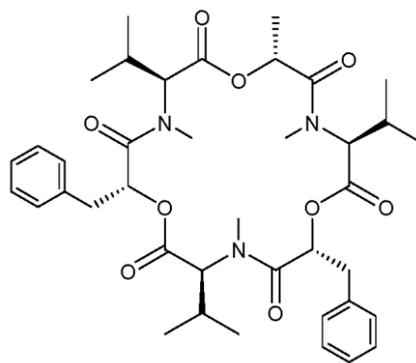
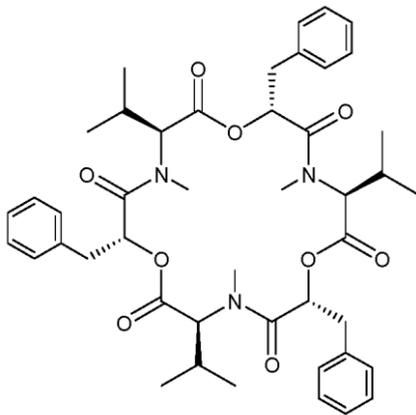


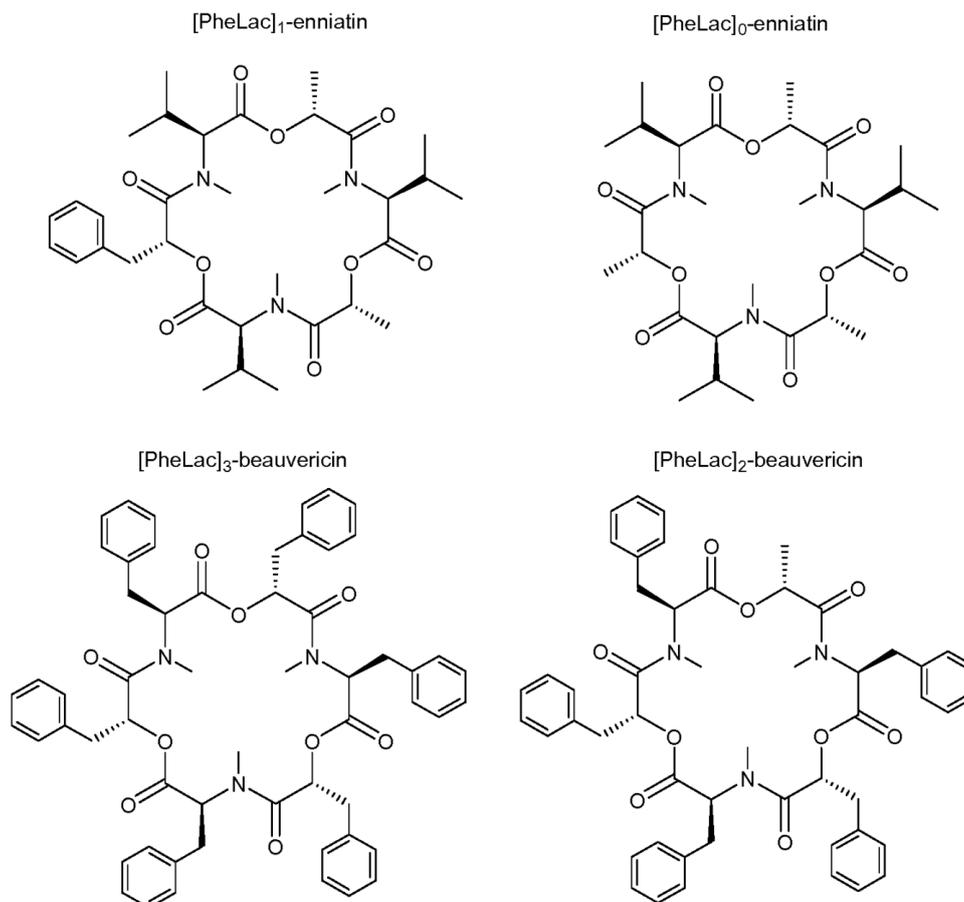
50



[PheLac]₃-enniain

[PheLac]₂-enniain





Adicionalmente es posible y se prefiere utilizar el presente procedimiento para producir compuestos marcados isotópicamente y/o en particular deuterados que se pueden utilizar como referencias en las aplicaciones analíticas, por ejemplo, en análisis de micotoxinas.

- 5 La invención se explica adicionalmente por los siguientes ejemplos en referencia a las Figuras. Que muestra:
- Figura 1 Una vista esquemática de la disposición de módulos de la ciclohexadepsipéptido sintetasa (aquí, la Enniatin sintetasa);
- Figura 2 Vista esquemática del sistema de expresión integrado e inducible en hongos filamentosos;
- Figura 3 Mapa del vector del plásmido de expresión con Enniatin sintetasa;
- 10 Figura 4 Vista de eventos de integración única o múltiple en el locus *pyrG*;
- Figura 5 Espectro de ¹H-NMR de Enniatin B obtenida por expresión heteróloga de la correspondiente sintasa de *A. niger*;
- Figura 6 Espectro de MS de Enniatin B obtenido por expresión heteróloga de la correspondiente sintasa de *A. niger*;
- 15 Figura 7 Espectro de MS/MS de Enniatin B obtenida por expresión heteróloga de la correspondiente sintasa de *A. niger*;
- Figura 8 Espectro de ¹³C-NMR de Enniatin B obtenida por expresión heteróloga de la correspondiente sintasa de *A. niger*;
- Figura 9 Estructura cristalina por rayos X de Enniatin B;
- 20 Figura 10 Derivados de Enniatin preferidos;
- Figura 11 Datos analíticos de cloroEnniatin;

- Figura 11a Datos analíticos de la Beauvericin obtenida de *A. niger*;
- Figura 12 Estrategia para para el intercambio completo de módulos entre dos secuencias que codifican NRPS fúngicas;
- 5 Figura 13 Región homóloga seleccionada para el intercambio del módulo de activación de ácido hidroxicarboxílico entre PF1022 y Enniatin/Beauvericin sintetasa;
- Figura 14 Vista de la generación de la NRPS fúngica híbrida: Boceto de una PFSYN/ESYN híbrida que contiene un módulo 1 de PFSYN y un módulo 2 de ESYN. El ácido hidroxicarboxílico específicamente viene de PF1022 (D-Phe-Lac/D-Lac), la especificidad de aminoácido de ESYN (L-leu) para generar nuevos ciclodepsipéptidos;
- 10 Figura 15 HPLC-ESI-MS de derivados quiméricos de Enniatin [PheLac]₀₋₃. Disolvente A: agua con un 0.1 % de HCOOH, disolvente B: acetonitrilo con ACN con un 0,1 % de HCOOH. Caudal: 0,2 ml/min. Las mediciones se llevaron a cabo con ESI-Orbitrap-M, Exactive, Thermo Fisher Scientific, HPLC Serie 1200 (Agilent Technologies) y un gradiente del 5 % al 100 % de 1 a 8 min y posteriormente un 100 % de B durante 5 minutos más. Columna: Grace Grom-Sil 120 ODS-4 HE, 2 x 50 mm, 3 µm, TCC = 20 °C;
- 15 Figura 16 Determinación de identidad de ciclodepsipéptidos de Enniatin [PheLac]₀₋₃ quiméricos por mediciones de MS en tándem. La m/z de los fragmentos (escisión en enlaces peptídicos o éster) se corresponde con pérdida de uno a varios amino o hidroxiaácidos según se indica. Disolvente A: agua, disolvente B: isopropanol. Caudal: 0,4 ml/min. Agilent Technologies ESI-Triple-Quadrupol-MS, Serie 6460, UHPLC 1290 Serie Infinity (Agilent Technologies). Columna: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 3,0 x 50 mm. TCC = 45 °C.
- 20 Figura 17 Estructura de la fórmula de la Enniatin [PheLac]₃ y MS HR-ESI-Orbitrap para la determinación de la fórmula molecular;
- Figura 18 Cambio de la especificación de ácido hidroxicarboxílico de Beauvericin (D-Hiv) en PF1022 (D-PheLac/D-Lac);
- 25 Figura 19 HPLC-ESI-MS de derivados de la Beauvericin [PheLac]₂₋₃ quimérica. Disolvente A: agua con un 0,1 % de HCOOH, disolvente B: acetonitrilo con ACN con un 0,1 % de HCOOH. Caudal: 0,2 ml/min. Las mediciones se llevaron a cabo con ESI-Orbitrap-MS, Exactive, Thermo Fisher Scientific, HPLC Serie 1200 (Agilent Technologies) y un gradiente del 5 % al 100 % de 1 a 8 min y posteriormente un 100 % de B durante 5 minutos más. Columna Grace Grom-Sil 120 ODS-4 HE, 2 x 50 mm, 3 µm. TCC = 20 °C;
- 30 Figura 20 Determinación de la identidad de los ciclodepsipéptidos de Beauvericin [PheLac]₂₋₃ por mediciones MS en tándem. La m/z de los fragmentos (escisión de enlaces peptídicos y éster) se corresponde con la pérdida de uno o varios amino o hidroxiaácidos según se indica. Disolvente A: agua, disolvente B: isopropanol. Caudal 0,4 ml/min. Agilent Technologies ESI-Triple-Quadrupol-MS, Serie 6460, UHPLC 1290 Serie Infinity (Agilent Technologies). Columna: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 3,0 x 50 mm. TCC = 45 °C;
- 35 Figura 21 Cromatograma de iones extraídos de Enniatin B d18 obtenida de la cepa de *A. niger* dependiente de alimentación. Esta sustancia se puede utilizar como una referencia interna para la determinación de Enniatin en cultivos. No se había informado aún de una referencia deuterada. El sistema permite la síntesis de variantes de Enniatin, así como variantes de Beauvericin deuteradas.
- 40 Figura 22 Cromatograma total de iones de Enniatin B [3-Br-Lac]₁ [Lac]₂ y MS en tándem de Enniatin B [3-Br-Lac]₁ [Lac]₂;
- Figura 23 MS en tándem de Enniatin B [3-F-Lac]₃;
- 45 Figura 24 MS en tándem de enniatin B [3-N₃-Lac]₃. El grupo azido permite la adición de 1,3-ciclo dipolar para la modificación química adicional de la variante de enniatin; y
- Figura 25 MS en tándem de enniatin B [3-I-Lac]₃ obtenida por biosíntesis dirigida por precursor en *A. niger*. Las variantes de enniatin que contienen yodo se someten a reacciones de eliminación y sustitución.

A. Hongos filamentosos como huéspedes de expresión

50 1. Términos y definiciones

- Huésped:

- Un hongo filamentoso que pertenece a la especie *Aspergillus niger*
- Huésped dependiente:
 - Un huésped que es capaz de sintetizar ciclodepsipéptidos solo si se añaden precursores (hidroxiácidos) al medio (ejemplo: cepa DS3.1 de *A. niger*)
- 5 • Huésped independiente:
 - Un huésped que es capaz de sintetizar ciclodepsipéptidos sin adición de los precursores (ejemplo: cepa OV3.4 de *A. niger*)

2. Protocolo: Transformación mediada por PEG de *A. niger*

10 El gen *esyn1* de *F. oxysporum* se integró en el plásmido pVG2.2 para dar el plásmido pDS4.2 (Figura 3) que comprende los tres componentes del sistema Tet-on: *pgpdA::rtTA2S-M2* para la expresión constitutiva del transactivador rtTA, *tetO7::Pmin::esyn1*, que media la expresión de *esyn1* de una manera dependiente de la Dox y el casete *pyrG**, necesario para la selección y direccionamiento del sistema al locus *pyrG* de *A. niger*.

15 La transformación que se lleva a cabo de *A. niger* se basa en el procedimiento descrito por Punt y col. Las cepas receptoras que se utilizan eran negativas a proteasa (*prtT*⁻) y auxótrofa a uracilo (*pyrG*⁻). Las construcciones utilizadas llevan un gen *pyrG* mutado (*pyrG**), que permite a los transformantes crecer en un medio que carece de uridina solamente después de la captación del ADN ajeno y después de la recombinación homóloga de *pyrG** con una versión mutada del gen *pyrG* de *A. niger* (ambas mutaciones están en diferentes localizaciones). La Enniatin sintetasa se expresaba bajo el control del sistema de expresión Tet-On.

3. Materiales y soluciones:

<u>SMC:</u>	1,33 M de sorbitol 50 mM de CaCl ₂ 20 mM de tampón MES pH 5,8
<u>TC:</u>	50 mM de CaCl ₂ 10 mM de Tris/HCl pH 7,5
<u>STC:</u>	1,33 M de sorbitol en TC
<u>Tampón PEG:</u>	7,5 g de PEG-6000 TC hasta 30 ml
<u>ASP+N (50x):</u>	350 mM KCl 550 mM de KH ₂ PO ₄ 3,5 M de NaNO ₃ pH 5,5
<u>Vishniac:</u>	76 mM de ZnSO ₄ 178 mM de H ₃ BO ₃ 25 mM MnCl ₂ 18 mM FeSO ₄ 7,1 mM CoCl ₂ 6,4 mM CuSO ₄ 6,2 mM NaMoO ₄ 174 mM EDTA
<u>Solución de protoplastación:</u>	250 mg de enzima de lisis de <i>Trichoderma harzianum</i> (Sigma) SMC hasta 10 ml pH 5,6

(continuación)

<u>MM:</u>	20 ml de ASP+N (50x) 20 ml de glucosa (50 %) 2 ml de MgSO ₄ 1 ml de Vishniac H ₂ O hasta 1 l (adición de un 2 % de agar para el medio sólido)
<u>CM:</u>	MM, suplementado con: 10 ml casaminoácidos (10 %) 50 ml de extracto de levadura (10 %) H ₂ O hasta 1 l (adición de un 2 % de agar para el medio sólido)
<u>Placas de transformación:</u>	325,19 g de sacarosa 20 ml de ASP+N 2 ml de MgSO ₄ 1 ml de Vishniac 12 g de agar
<u>Agar superior:</u>	325,19 g sacarosa 20 ml de ASP+N 2 ml de MgSO ₄ 1 ml de Vishniac 6 g de agar

4. Procedimiento experimental

5 Las cepas receptoras (por ejemplo, MA169.4 o AB1.13) se cultivaron en 100 ml de CM (+10 mM de uridina) a 30 °C y 120 rpm durante 10-16 h. El micelio se recolectó sobre un filtro myra cloth y se lavó una vez con SMC. A continuación, se añadió el micelio a la solución de protoplastación (en un tubo de ensayo de 50 ml) y se incubó durante 1-1,5 h a 37 °C y 80 rpm. La protoplastación se confirmó mediante microscopía. Después, los protoplastos se recolectaron en un filtro myra cloth y se lavó una vez con STC. La suspensión se centrifugó durante 10 min a 10 °C y 200 rpm. El sobrenadante se decantó y el aglomerado se resuspendió con cuidado en 1 ml de STC. La suspensión se transfirió a un tubo de Eppendorf y se centrifugó durante 5 min a 10 °C y 6000 rpm. De nuevo se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los protoplastos en 1 ml de STC. La etapa de lavado se repitió dos veces. Para cada transformación, se añadieron 100 µl de protoplastos, 10 µg de plásmido pDS4.2 (en 10 µl de H₂O) y 25 µl de tampón PEG a un tubo de ensayo de 50 ml y se mezcló suavemente. Se añadió 1 ml de tampón PEG al tubo y se mezcló suavemente. Después de 5 min, se añadieron 2 ml de STC y se mezcló. Se añadieron 20-25 ml de agar superior (enfriado a 40 °C) a la mezcla y se vertió en las placas de transformación preparadas (Ø 15 cm). Las placas se incubaron a 30 °C durante 3-4 días. A continuación, los transformantes se purificaron dos veces dividiendo las esporas en placas MM para el aislamiento de colonias. Las cepas purificadas se analizaron por PCR y transferencia de Southern para confirmar la captación e inserción apropiadas del plásmido pDS4.2 en el genoma de las cepas receptoras (véase la Figura 3).

20 5. Datos analíticos del huésped mutante DS3.1 dependiente que sintetiza Enniatin y CloroEnniatin (Figuras 9 5 a 11)

Condiciones de cultivo:

25 Con el fin de identificar las condiciones óptimas para la producción de enniatin con alto rendimiento se siguió un diseño de la estrategia experimental utilizando el programa de software estadístico MODE. Se variaron los siguientes parámetros en cultivos en matraz con agitado de la cepa DS3.1 que expresa esyn1: composición del medio (medio mínimo, medio completo, medio definido para Fusarium), aminoácidos (en particular L-valina, L-leucina, L-isoleucina) con un suplemento de 0-20 mM), hidroxiácidos (en particular D-Hiv) con un suplemento de 0-50 mM), concentración de glucosa (1-5 %), temperatura, tiempo de cultivo (1-92 h) y concentración de Dox (0-20 µg/ml). Los parámetros que afectaban los rendimientos de enniatin eran Dox y D-Hiv. El mejor medio de cultivo que se identificó contenía 20 mM de D-Hiv, 20 mM de uno de los aminoácidos y 10 µg/ml de Dox. Esta composición de medio mejoraba el rendimiento de Enniatin un factor de 200. El rendimiento de enniatin se aumentaba adicionalmente aproximadamente 4,75 veces aumentando la concentración al 5 % y por adición de talco.

30

<u>Medio de producción de Enniatin (EM):</u>	20 ml de ASP+N (50x)
	100 ml de glucosa (50 %)
	2 ml de MgSO ₄
	1 ml de Vishniac
	10 ml de casaminoácidos (10 %)
	50 ml de extracto de levadura (10 %)
	100 ml talco (10 % en 50 mM de tampón de acetato de Na, pH 6,5)
	H ₂ O hasta 1 l

5 La cepa DS3.1 (inoculación con 5×10^6 esporas/ml) se cultivó en EM a 26 °C y 250 rpm. Tras 16 h, se añadieron 10 mM o 20 mM de D-Hiv, 20 mM de L-Val y 10 µg/ml de Dox. La biomasa se recolectó después de 92 h, se liofilizó y se extrajo la Enniatin B con acetato de etilo.

Procedimientos analíticos (véase las Figuras 5-9, 11):

10 Se registraron los espectros de ¹H-NMR y ¹³C-NMR de Enniatin B en un espectrómetro NMR Bruker Avance 400. Se dieron los cambios químicos en 8 unidades (ppm) con respecto a la señal de disolvente. Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro Jasco FT-IR 4100. El HRMS se llevó a cabo utilizando la técnica ESI en un aparato LTQ Orbitrap XL. Las muestras de Enniatin se infundieron directamente en el espectrómetro de masas.

15 Los datos de la determinación de la estructura cristalina simple de Enniatin B se recogió en un difractor Xcalibur Diffraction-Oxford, equipado con un detector de área de CCD Sapphire S y un monocromador de grafito utilizando radiación MoK_α (λ= 0,71073 Å). Los cristales adecuados se adjuntaron a las fibras de cristal utilizando aceite de fluoropoliaquiléter (ABCR) y se transfirió a un goniostato en el que se enfriaron a 150 K para la recolección de datos. Paquetes de software utilizados: CrysAlis CCD para la recolección de datos, CrysAlis Pro para el refinamiento celular y reducción de datos.

Resultados:

Enniatin B: Se podía obtener una producción de Enniatin B hasta 1000 mg/l en la cepa DS3.1 y se verificó por análisis MRM

20 Se podían aislar 393 mg de Enniatin B de la biomasa (27,5 mg) y el caldo de 1 l de cultivo del transformante DS3.1 con suplemento de 10 mM de d-Hiv y 20 mM de L-Val al medio.

25 La Enniatin B aislada se analizó por MS, MS/MS, IR, NMR y cristalografía de Rayos X (véase las Figuras 5-10): ¹H-NMR (400,1 MHz, CDCl₃) δ = 5,11 (d, ³J_{HH} = 8,7 Hz, 3 H), 4,49 (d, ³J_{HH} = 9,7 Hz, 3 H), 3,11 (s, 9 H), 2, 32-2,21 (m, 6 H), 1,05-0,86 ppm (m, 36 H); ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ = 170,25, 169,31, 75,67, 63,20, 33,26, 29,91, 27, 92, 20,42, 19,34, 18,72, 18,50 ppm; IR(neto): ν = 2963,6-2873,4 (C-H, CH₃ y CH), 1736, 1 (C=O, éster), 1660,9 (C=O, amida), 1183, 6 (C-H, isopropilo) 1011,0 (CO, ácido α -hidroxicarboxílico); ESI-HRMS: m/z calculado para [C₃₃H₅₇N₃O₉+Na]⁺: 662, 39870; encontrado: 662,39859.

Generación de análogos de Enniatin

Protocolo de experimentos de alimentación

30 Se cultivó la cepa DS3,1 en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente, En vez de D-Hiv, se añadió el correspondiente clorolactato de hidroxiaácido (10 mM de concentración final). La alimentación se puede llevar a cabo una vez o repetidamente en diferentes intervalos de tiempo durante el cultivo discontinuo o semi-continuo.

Una estrategia equivalente se proporciona para la Beauvericin (véase la Figura 11a).

B) Procedimientos y datos analíticos para la generación de una sintetasa híbrida

35 1. Estrategia de clonación para generar sintetisas químicas (véase la Figura 12-14, 18):

40 Se adquirieron los plásmidos de expresión que utilizan el promotor T7 para la expresión heteróloga en *E. coli* en Merck Millipore. La expresión proteica de todos los genes híbridos que codifican las NRPS se clonaron por inserción mediante los sitios de transcripción en la copia alta del plásmido pRSF-Duet1. Se llevó a cabo la biosíntesis combinatoria por un sistema mediado por recombinación A. Las secuencias del dominio o el módulo deseado se amplificaron mediante PCR (polimerasa Q5, High-Fidelity, New England Biolabs) y se subclonaron en pRSF-Duet1. Se integró un marcador genético (que codificaba una secuencia de resistencia a estreptomicina) que es necesaria

después de la recombinación en un único sitio de restricción en el fragmento subclonado. Los clones positivos se exploraron por la resistencia a la estreptomycin y posteriormente se eliminó la resistencia por estricción y auto-ligamiento del sitio cortador único flanqueante. Las células de *E. coli* BW25113 electro competentes se transformaron con el vector deseado con el gen original NRPS se cultivaron a 30 °C para proteger el plásmido termolábil pIJ790 que alberga la λ -recombinasa RED (*gam*, *bet*, *exo*) y proteínas protectoras de ADN. La expresión de la recombinasa se indujo por adición de arabinosa antes de que las células de *E. coli* BW25113 se transformaran con el módulo que contenía el plásmido hasta 70 pares de bases se escogieron como región homóloga de solapamiento (modificado después de Gust y col. / Zhang y col. 1998).

2. Producción de Enniatin y Beauvericin químicas con sintetasas químicas expresadas en *E. coli*:

10 Condiciones de cultivo y extracción

Las células de *E. coli* BI21 gold se pre-cultivaron durante una noche a 37 °C en 20 ml de medio LB a 200 rpm. La inoculación del cultivo principal (50 ml de medio LB) con pre-cultivo en una relación 1:100 se cultivó hasta una DO600 a 37 °C y se indujo con IPTG a una concentración final de 0,25 mM (Carl Roth) y se incubó adicionalmente para la expresión proteica y producción de péptidos a 18 °C durante 24-48 h a 200 rpm. Las células se recolectaron y el aglomerado celular se extrajo con 5 ml de MeOH (de calidad técnica). La solución se sonicó durante 5 minutos y el sobrenadante se evaporó.

Análisis con HPLC-ESI-MS, HPLC-ESI-MS y MS en tándem (véase las Figuras 15-17, 19-25)

Para la analítica compleja de los extractos en bruto se re-disolvieron en 200-500 μ l de MeOH (calidad de HPLC) y los sólidos suspendidos se centrifugaron a 14.000 x g. Se llevó a cabo la HPLC-ESI-MS para explorar nuevos derivados. Para todas las mediciones, los inventores utilizaron tecnologías Agilent en cuanto a las columnas y el equipo de HPLC (Eclipse Plus C₁₈, 2,1 x 50 mm; UHPLC 1290 Serie Infinity, ESI-Triple-Quadrupol-MS, Serie 6460). Utilizando un sistema de fase móvil los inventores añadieron un 0,1 % de HCOOH en H₂O (A) y ACN (B) con un gradiente desde un 5 % a un 100 % durante 2,5 min y posteriormente un 100 % B durante 5,5 minutos más.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Technische Universitat Berlin

<120> Procedimiento para la obtención de metabolitos microbianos secundarios o derivados de los mismos mediante expresión heteróloga de al menos una sintetasa de dichos metabolitos secundarios en hongos filamentosos

<130> TU110WO

<150> EP14160821.6

<151> 20-03-2014

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9378

<212> ADN

<213> *Fusarium oxysporum*

<400> 1

ES 2 682 743 T3

atgtcaaaca	tggcaccact	ccctacgatg	ggcgttgagc	agcaagccct	atcactttca	60
tgccccttac	tcctcatga	cgatgagaaa	cactcagaca	acctttacga	gcaagcaact	120
cggcacttcg	gcttgagccg	agacaagatc	gaaaatgtct	taccatgtac	ttcctttcaa	180
tgtgatgtca	tagattgcgc	cgtcgacgat	cggcggcatg	ctatcggtea	cgtcgtctat	240
gatatcccca	atacagtgga	catccagcgt	ttagccgcag	cctggaaaga	ggttgtgagg	300
cagacaccaa	tcttgaggac	cggcattctt	acatcagaaa	ccggcgactc	ttttcagatc	360
gtcttgaaag	aaggctgcct	accgtggatg	tacgcgacat	gtctcggcat	gaagggggca	420
gtgatacaag	atgaagcagt	cgccgctatg	actggaccgc	gttgcaatcg	atatgtcgtc	480
ctggaggacc	cgagtacgaa	gcaaaggctg	ctcatctgga	cattcagcca	tgctttagtg	540
gattatacag	tccaggaacg	catccttcag	cgggttctca	cagtatacga	cggccgggac	600
gtcagagtgc	ctcgcaccaa	ggatacagaa	catgtctctc	ggttttgcca	acaacacttt	660
gaaggcttag	atgcctccgt	atttcccctt	ctaccatctc	acctaaactgt	gtgcaatccc	720
aatgcgcgcg	cagaacatca	tatctcatac	acgggaccag	tccagaggaa	gtgggtcccat	780
acaagtatct	gtcgggctgc	actcgcagtt	cttctatctc	gctttacaca	ctcttcggag	840
gccctcttcg	gtgttgtgac	agaacaatct	cacaactccg	aggaccaaag	acgggtcaatt	900
gatggccccg	caaggacagt	agtgcctatc	cgcgtccttt	gtgccccaga	tcaatatgtg	960
tgggatgtca	ttggggcaat	caccgcacac	gaacacgcca	tgcgcggggt	tgagcacgct	1020
ggacttcgca	atatccgccc	taccggagac	gacgggtctg	ctgcttgagg	attccagacc	1080
gtgctactgg	tgactgacgg	tgatgctccc	aagaccctcg	ggagtgtact	tcatcgaagt	1140
gtagaagaat	cggatagatt	catgccctgc	gctaactcgt	cccttctgct	cgactgccag	1200

ES 2 682 743 T3

atggctggca	actcggcatc	cctagtcgca	cgatatgatc	ataatgtgat	cgaccacgc	1260
cagatgtctc	gcttcctgcg	acagctagga	tacctgatcc	aacaatttca	tcatcacgtc	1320
gatctgcctc	tggtaaaaga	actggacgtc	gtgacggcgg	aggattgtgc	ggaaatcgag	1380
aatggaatt	cagaacgcct	aacaatgcaa	gacgccttaa	tccacgacac	catatccaag	1440
tgggctgctg	gogatcccaa	caaagctgca	gttttcgctt	gggatgggga	atggacatac	1500
gccgagctag	acaacatata	ctcccgtctc	gccgtgtata	tccaatccct	ggacttgaga	1560
ccaggacaag	caatactccc	actctgcttc	gagaagtcaa	aatgggtcgt	cgccacaatt	1620
ctcggcgtcc	tcaaagccgg	tggggcattc	acactcatcg	accctgcgca	cccctcggca	1680
aggatggccc	aggtctgtca	gcagacctcc	gccacagtgc	ctctcacctc	caaactccac	1740
aacaccacct	tacgttccgt	cgtttccgcg	tgcattgtgg	tgcacgacga	cctccttcgg	1800
tccttaccce	gcgccgatgg	ccgcttaaag	gccaccgtga	agccacagga	cttggcctat	1860
gttattttca	catctggcag	cacaggagag	ccgaaaggca	tcatgatcga	acatcggggg	1920
ttcgtgtcgt	gtgctatgaa	atttggcccc	gcgctcggaa	tggatgagca	cacgcgcgct	1980
cttcaattcg	cctcatatgc	gtttggcgct	tgtctggtag	aagttgtgac	agctctgatg	2040
cacggcggct	gcgtctgcat	cccttccgat	gacgatcgct	tgaacaatgt	accggagttc	2100
atcaaaaggg	cccaggtgaa	ctgggtgata	ctcactccgt	cgtatatcgg	gacattccag	2160
ccggaagatg	tccctggact	acaaacactg	gtattggttg	gagaacctat	ctcagcgtct	2220
attcgggata	cctgggcctc	ccaggttcga	ctcctgaatg	cctacggcca	gagtgaaagc	2280
tcaactatgt	gcagcgtcac	ggaagtcagc	ccgctctccc	tccaaccgaa	caatatcggc	2340
cgggctgtag	gcgcacgatc	ctggatcatt	gatcccgcgc	agcctgatcg	tcttgctcca	2400
attggctgca	ttggagagct	agtgatcgaa	agtcggggca	ttgcgcgcga	ctatatcctc	2460
gcgccgcgcg	cggacaagtc	cccctttctc	ctagcacccc	cggcctggta	tccagccggg	2520
aaattatcca	acgcctttaa	attttacaag	actggagatc	tcggtcgtta	tggacctgac	2580
ggcaccatcg	tctgcctggg	acgcaaagat	tgcgcaagtga	agatccgagg	gcagcgcgta	2640
gagatcagcg	cagtggaagc	cagtctacga	cgacaactac	ctagtgacat	catgcccgtg	2700
gccgaagcta	tcaaacgctc	ggattcgtca	ggcagcacag	tcttgactgc	cttcttgata	2760
gggtcatcta	agagtttata	tgcggcagac	gccgttatct	tggatcacgg	tgctaccaac	2820
gagataaacg	cgaagttgca	gcaaactcct	cccagcatt	cogttccatc	ctattatata	2880
cacatggaaa	atcttcctcg	aactgccacc	ggcaaagcgg	acaggaaaat	gcttcgatct	2940
attgctagca	agctattggg	tgaattgtct	cagaacgtga	catctcaacc	gattgagaag	3000
cacgatgccc	cagcaactgg	tatagaggtc	aagctgaagg	agctttgggt	tctgagcttg	3060
aatcttaatc	ccaactctca	agatgtcggg	gcgagtttct	ttgacttagg	cggaaattcc	3120

ES 2 682 743 T3

attatcgcca tcaaaatggt aaacatggcg aggtcagctg ggatagcact gaaggtatcc 3180
 gacatattcc agaatcccac gctcgetggt ctcaaggcta ttgtcattgg tacttcgctg 3240
 ccatacagcc ttattcccaa ggttaccgac caaggccctg ttagcgagca gtcttatgag 3300
 caaaacagaa tgtgggtcct ggatcagttg tctgagggtg cttcatggta tctgattcct 3360
 ttcgctgtgc gcatgcgagg tccggtggat gttgatgcgt tgacgcgtgc tttgctcgtc 3420
 cttgaacagc gtcatgagac actacgaact acatttgaga accaagatgg tgttgagatc 3480
 cagatcatcc atgatagact ctccaaagag ctacaagtca tcgatgcctt ggatgggtgac 3540
 gagggtggtc tcaagacact ctacaaagta gagaccacca cattcgacat cacatccgaa 3600
 gcaggtgga gctcaaccct catccgcctc ggcaaagacg atcacattct gtctatcgtc 3660
 atgcaccaca tcatctccga cggctggtcc atcgacgttc tccgccgcga actcatccaa 3720
 ctctacgccg ccgctctgca gggcaaggat ccttcctccg cactaaccct cctaccatc 3780
 cagtacagcg acttcgccgt gtggcagaag caggaggccc aagcagctga gcacgagagg 3840
 cagctccagt actggaagaa gcaactcgca gatagttcac ctgccaaagat ccctaccgac 3900
 tcccccgtc cagatctcct gtccggtgac gcaggcgttg tgcccgttgc catcgacggc 3960
 gagctgtatc agaaactaag gggcttctgc aacaagcaca acagcactgc cttctccatc 4020
 ctgctcgtg ctttccgagc ggcgcattac cgtctcacag ccggtgacga cgcctgac 4080
 ggcatcccca ttgcaaaccg taaccgctgg gagctggaga acatgattgg tttctttgtc 4140
 aacacgcagt gtatgcgcat cgcggtgac gagacggata catttgagag tctggtgagc 4200
 caggtcagat ctaccactac agctgcggtt gcgcacgagg atgtcccctt cgagcgtgtc 4260
 gtttcagcgc ttcagcctgg ccatagagat ctctcgcgaa caccgctggc acagataatg 4320
 tttgctgttc actcgagaa ggacccttga cgtttcgagc tggaggggat ccagctctgag 4380
 cctatcgcca gcaaggccta caccagattc gatgtcgagt tccatctggt ccaacaggca 4440
 gacggactga agggcagttg caactttgcc acagatctct tcaagcccga aactatccag 4500
 aatgttgtca gcgtgttttt ccagattcta cgcctatggc ttgaccagcc tgagacgtgt 4560
 atctcggttc ttccactgac tgatggagtc gaggagcttc gcaggttggg tctgctggaa 4620
 atcaagagga ctaactacc tcgcgattcg agcgtggtag atgtcttccg cgaacaagct 4680
 gccccaacc cagaggttat cgctgttacc gactcatctt ctgctctgac ttatgcagag 4740
 ctggacaata agtctgagct gctctcacga tggcttcgac gacgtaactt gacgccagag 4800
 acgctggatc gtgttcttgc tccccgtct tgcgagacta tcgttgcta tgttggtatc 4860
 ctcaaggcga acctggcgta tcttctctt gacgtgaggt ccccggtgac tcgtatgaag 4920
 gacatcttgt cgagcgtgtc tggaaacacc atagttctta tgggctctgg ggtagaggat 4980

ES 2 682 743 T3

cctggctttg acttaccgca actagagctc gtacgcatca cggacacttt cgatgagacc 5040
atcgaggacg tgcaagactc tccccaacgg tctgccacaa gcctcgccta cgtcgtcttc 5100
acatccggtt caactggtaa acccaagggc gtcgatgctg agcaccgggc cattgtgcgt 5160
ctcgtcaaga gtgacaactt tcctggcttc ccctcccccg ctcgcatgtc aaatgtcttc 5220
aaccctgcct togacggagc catctgggag atcaactgga tgctcctgaa cggcgggaaca 5280
gtcgtctgca togactacct gaccaccctg gacggcaaag agctcgtgc tgtgttcgcc 5340
aaagagcgcg tcaacgccc cttcttcgca cctgggatgc tcaagctta cctcgttgat 5400
gcgcgcgagg ctttgaagaa tcttgacttc cttattgttg gaggtgagag gttcगतacc 5460
aaggaagccg tggaggccat gccgcttgtg agaggcaaga ttgccaatat ctatggtccg 5520
actgaggctg gaataatcag cacgtgctat aacatcccca aggatgaggc ttacaccaat 5580
ggtgttccca ttggtggaag tatctacaac tctgggtgct acgtcatgga tctaaccag 5640
caacttgctg gccttggcgt catgggagag cttgttgтта ccggagacgg tgttggtcga 5700
ggctacacta accccgagct caacaagaac cgcttcctcg acatcaccat cgagggcaag 5760
actttcaagg cttaccgtac tggtgaccgg atgcgtgcac gagtaggcga cggctctcctt 5820
gagttcttcg gcgcatgga caaccagttc aagatccgcg gcaaccgtat cgaagcaggg 5880
gaagttgagt ctgccatgct cagcctcaag aatgtcctta acgccgccat tgtcgtccgc 5940
gggggcggag aagatgaagg gccactcgag atggtcggat tcatcgtcgc ggacgacaag 6000
aatgatacca cggaggagga agagacaggc aaccaagttg agggctggca ggaccatttc 6060
gagagtggta tgtactcgga tatcagcacc gccgtggacc aatctgccat tggaaacgac 6120
ttaaagggct ggacttctat gtacgatggt aaggatatcg acaagggcga gatgcaggag 6180
tggttggaag acgctattca caccctgcat aacggccaga tcctcgcga tgtcctcgag 6240
atcggtagcg gtagtggtat gatcctgttc aacctcaacc cgggcctcaa cagctacgtt 6300
ggtcttgatc catccaagtc agcagtcgag ttcgtcaaca gagccgtcga gtcctctccc 6360
aagttcgcag gaaaagccaa ggtccacgtc ggcattggcca cagacgtcaa caaactcggc 6420
gaagtacacc ccgatctcgt ggtcttcaac tccgttgttc aatacttccc cacacccgag 6480
tatctgcgag aggtcatcga tggcctcatt gccatcccca gcgtcaagcg catcttcttt 6540
ggcgatatca gatcatatgc taccaacgga cacttctctg ccgcacgcgc catccacaag 6600
ctcggcacca ataacaacgc caccaaggat aggggtgcgcc agaagatcca ggagctggag 6660
gatcgagagg aagagtttct cgttgagcct gccttcttca ccactctgaa ggagcgaagt 6720
ccagatgttg tcaagcatgt tgagatcatc cccaagaaca tgaaggccac caacgaactc 6780
agcgcctatc gctacacggc tgttgctgat ctgcccggatg aaacggacga acctgtgtat 6840
catattgaga aggatagctg ggttgacttt gaggcgaagc agatggacaa gacggctctt 6900

ES 2 682 743 T3

ottgaccacc tgcgcctctc caaggatgct atgagtgtgg cggttagcaa catcacctac 6960
 gccacactg cctttgaacg tcgtatcggt gagtctctcg atgaggatag caaggatgac 7020
 accaagggtg cactcgatgg tgcagcctgg ctctcagcag ttcgctccga agccgaaaac 7080
 cgcgcctcac tcaccgtccc cgacatcctg gagatcgcca aagaggctgg tttccgagtt 7140
 gaagtacgcg ctgctcgcca gtggtcccaa agtggtgctt tagacgcagt cttccaccac 7200
 tttccaccct ccagcactga ccgcactcta atccagttcc ccacggacaa cgagcttcga 7260
 tcatcactca ccctcgccaa ccgcctctc cagaagctgc agcgcctcg tgcgctctg 7320
 caagtccgcg agaagctcca gacgctggtc ccgtcttaca tggttcctcc gaatatcgtg 7380
 gtgctggaca cgatgcctct caatactaac ggcaagatcg acagaaagga gcttacgcgt 7440
 agagcacgaa cactgccgaa gcagcagact gcggcgcctg tgccggactt ccctatctct 7500
 gatatcgaga tcacgctgtg cgaggaggca actgaggtct ttggaatgaa ggttgaatc 7560
 agcgatcact tcttccagct cggcggtcac tctctcctcg ctacgaaact catttctcgc 7620
 atccagcacc gtctccatgt gcgggttact gtgaaggacg tattcgacag ccctgtcttt 7680
 gccgatctgg cagtcatcat ccgtcaagga cttgctatgc agaaccctgt tgctgaagga 7740
 caggacaagc aaggctggtc ctcgagagtt gccctcgtg cagaagtcga gaagatgctg 7800
 tgcgaggagt tcgcagctgg tcttggtgtc ccggttggtg tcaactgaaa cttcttcgat 7860
 ctcggtggtc actcgtcat ggctactaag ctgctgtgtc gaattggccg tcgccttgat 7920
 accgccatca cagtcaagga catcttcgac taccctgtgc tttccaatt ggcgaagaag 7980
 ttggagtctt cgcattccaa gagctacgag gagtctggcg acgatatcca gatggccgat 8040
 tacactgcat tccagctcct cgatctggaa gacccccaa actttgttca gtcccagatt 8100
 cggcctcaac tggactcctg ctacggcacc atccaggatg tctaccctgc tacgcagatg 8160
 caaaaggcct tcctcttcga tcccacgacc ggcgagcccc gaggtcttgt gcctttctat 8220
 atcgacttcc ccagcaatgc agatgccgag accctcacca aggctatcgg agctctagtt 8280
 gacaagctcg atatgttcag aactgtcttc ctggaggccg caggcgatct gtaccaagtt 8340
 gtcggtgagc acctcaactt gcctattgag accatcgaga ctgagaagaa cgtcaacact 8400
 gcaaccggtg actacctgga tgttcatgga aaggaccctg tccgtctagg ccaccctgc 8460
 atccaattcg ccacctgaa gactgcctcc tctgtacgtg ttctcctcgc aatgtcccac 8520
 gctctgtatg atggtttgag ttttgagtac atcgtccgtg gtctccacgt tctctacagc 8580
 ggtagaaacc tccccccacc aacacagttt gcgcgataca tgcagtatgc tgcacacagt 8640
 cgtgaagaag gttatccctt ctggcgcgag gttctgcaga acgcgcccat gacagttcta 8700
 cacgacacca ataacggtat gtctgagcaa gagatgccag cctccaagge ggtacacctg 8760

ES 2 682 743 T3

tcagaggtcg tcaacgttcc agcgcaagct attcgaaaca gtaccaacac ccaagcgacc 8820
 gtcttcaaca ccgcctgtgc ccttgtccta gccaaaggaat ccggctcaca ggatgtcgtc 8880
 ttcggccgta ttgtctctgg tcgacaaggt ctaccagtcg tctggcagga catcatcggc 8940
 ccctgcacaa acgcctgtcc cgtccacgca cgcgtcgacg atggaaacct ccaacgcctc 9000
 atccgggacc tacgggacca atacctccgc actctgccct togaatcgct tggcttcgag 9060
 gaaatcaagc gtaactgcac ggactggccc gaagaattga ccaacttctc tgtctgcgtg 9120
 acgtaccaca acttcgagta ccaccccgag agcgaagttg acaacccaaa ggttgagatg 9180
 ggagttttgg caaagtatgt tgagttgagt gaaaacgagc cgctgtacga tcttctatt 9240
 gcgggagagg ttgaggcgga tggagttaac ctgaaggcca ctgttgttgc aaaggcaagg 9300
 ctttacaatg aggcgaggat tagacatgtg cttgaggaag tttgcaaac tttcaatggt 9360
 ttgaacgagg cttttag 9378

<210> 2
 <211> 9471
 <212> ADN
 <213> *Beauveria bassiana*

5

<400> 2

atgtcaaaca tggcaaccact ccctacgatg ggcggtgagc agcaagccct atcactttca 60
 tgccccctac tcctcatga cgatgagaaa cactcagaca acctttacga gcaagcaact 120
 cggcacttcg gcttgagccg agacaagatc gaaaatgtct taccatgtac ttcctttcaa 180
 tgtgatgtca tagattgcgc cgtcgacgat cggcggcatg ctatcggcca cgtcgtctat 240
 gatatcccca atacagtga catccagcgt ttagccgcag cctggaaaga ggttgtgcgg 300
 cagacaccaa tcttgaggac cggcatcttt acatcagaaa ccggcgactc ttttcagatc 360
 gtcttgaaag aaggctgcct accgtggatg tacgcgacat gtctcggcat gaagggggca 420
 gtgatacaag atgaagcagt cgcgcctatg actggaccgc gttgcaatcg atatgtcgtc 480
 ctggaggacc cgagtaagaa gcaaaggctg ctcatctgga cattcagcca tgcttttagtg 540
 gattatacag tccaggaacg catccttcag cgggttctca cagtatacga cggccgggac 600
 gtcgagtgcc ctgcaccaa ggatacagaa catgtctctc ggttttggca acaacacttt 660
 gaaggcttag atgcctccgt atttccctt ctaccatctc acctaaactgt gtgcaatccc 720
 aatgcgcgcg cagaacatca tatctcatac acgggaccag tccagaggaa gtggtcccat 780
 acaagtatct gtcgggctgc actcgcagtt cttctatctc gctttacaca ctcttcggag 840
 gccctcttcg gtgttgtagc agaacaatct cacaactccg aggaccaaag acggtcaatt 900
 gatggccccg caaggacagt agtgccctatc cgcgtccttt gtgccccaga tcaatatgtg 960
 tcggatgtca ttggggcaat caccgcacac gaacacgcca tgccggggtt tgagcacgct 1020

10

ES 2 682 743 T3

ggacttcgca atatccgccg taccggagac gacgggtctg ctgcttgtgg attccagacc 1080
 gtgctactgg tgactgacgg tgatgctccc aagaccctcg ggagtgtact tcatcgaagt 1140
 gtagaagaat cggatagatt catgccctgc gtaaatcgtg cccttctgct cgactgccag 1200
 atggctggca actcggcatc cctagtcgca cgatatgatc ataatgtgat cgaccacgc 1260
 cagatgtctc gcttcctgcg acagctagga tacctgatcc aacaatttca tcatcacgtc 1320
 gatctgcctc tggtaaaaga actggacgtc gtgacggcgg aggattgtgc gaaaatcgag 1380
 aatggaatt cagaacgcct aacaatgcaa gacgccttaa tccacgacac catatccaag 1440
 tgggctgctg gcgatcccaa caaagctgca gttttcgctt gggatgggga atggacatac 1500
 gccgagctag acaacatata ctcccgtctc gccgtgtata tccaatccct ggacttgaga 1560
 ccaggacaag caatactccc actctgcttc gagaagtcaa aatgggtcgt cgccacaatt 1620
 ctgcgccgctc tcaaagccgg tggggcattc aactcatcg acccgtgcga ccctcggca 1680
 aggatggccc aggtctgtca gcagacctc gccacagtcg ctctcacctc caaactccac 1740
 aacaccacct tacgttccgt cgtttccgcg tgcattgtgg tcgacgacga cctccttcgg 1800
 tccttaccctc gcgccgatgg ccgcttaaag gccaccgtga agccacagga ctltggcctat 1860
 gttatthtca catctggcag cacaggagag ccgaaaggca tcatgatcga acatcggggg 1920
 ttcgtgtcgt gtgctatgaa atttggcccc gcgctcggaa tggatgagca cacgcgcgct 1980
 cttcaattcg cctcatatgc gtttggcgct tgtctggtag aagttgtgac agctctgatg 2040
 cacggcggct gcgtctgoat cccttcgat gacgatcgtc tgaacaatgt accggagttc 2100
 atcaaaaggg cccaggtgaa ctgggtgata ctactccgt cgtatatcgg gacattccag 2160
 ccggaagatg tccctggact acaaactg gtattggttg gagaacctat ctcagcgtct 2220
 attcgggata cctgggcctc ccaggttcga ctctgaatg cctacggtca gagtgaagc 2280
 tcaactatgt gcagcgtcac ggaagtcagc ccgctctccc tcgaaccgaa caatatcgg 2340
 cgggctgtag gcgcaagatc ctggatcatt gatcccagc agcctgatcg tcttgcctca 2400
 attggctgca ttggagagct agtgatcga agtccgggca ttgcgcgcga ctatatcctc 2460
 gcgccgcgcg cggacaagtc cccctttctc ctagcaccoc cggcctggta tccagccggg 2520
 aaattatcca acgcctttaa attttacaag actggagatc tcgtgcgtta tggacctgac 2580
 ggcaccatog tctgcctggg acgcaaagat tcgcaagtga agatccgagg gcagcgcgta 2640
 gagatcagcg cagtggaaagc cagtctacga cgacaactac ctagtgacat catgcccgctg 2700
 gccgaageta tcaaacgctc ggattcgtca ggcagcacag tcttgactgc cttcttgata 2760
 gggctcateta agagtttata tgcggcagac gccgttatct tggatcacgg tgetaccaac 2820
 gagataaacg cgaagttgca gcaaatcctt cccagcatt ccgttccatc ctattatatac 2880
 cacatggaaa atcttctctg aactgccacc ggcaaagcgg acaggaaaat gcttcgatct 2940

ES 2 682 743 T3

attgctagca agctattggg tgaattgtct cagaacgtga catctcaacc gattgagaag 3000
 cacgatgcc cagcaactgg tatagaggtc aagctgaagg agctttgggt tctgagcttg 3060
 aatcttaatc ccaactctca agatgtcggg gcgagtttct ttgacttagg cggaaattcc 3120
 attatcgcca tcaaaatggt aaacatggcg aggtcagctg ggatagcact gaaggatatcc 3180
 gacatattcc agaatcccac gcttgctcgt cttcaggccg tgatgagcgg cgattctacg 3240
 ccctcgacca tcacgacgcc ctttgccacc attccggcgt cgacttggga cggaccogtt 3300
 gagcagtctt actctcaagg tcgattgtgg ttccctcgacc agctggatat tggagctgta 3360
 tggtagctga taccttatgc cgttcgcatg cggggagctc tcaacattga cgctctacgt 3420
 gctgctctgc tggcgttggg gcagcgacac gagaccctgc ggacgacctt tgagaaccaa 3480
 aacgggtgtag gagtgcagat tgttcaccaa agacttgcca aggagctgaa aattatcgat 3540
 gcgtcgtccc acggcgatga cggctacctc cagccacttg agcaggagca gaccactcca 3600
 ttgatctga cttgtgaggc gggctggagg gcatcactca tctgcgtcgg cgaggaccat 3660
 catgtcttgt ctattgtcat gcatcacatt gtctccgatg gctggccat tgacgtgctg 3720
 cggcaagaac taggccagct ctacgcagcg gttttgcatg gcgacgagga tcctctgtcg 3780
 gccgtgagcc cgtccccat acagtatcga gacttttcca tgtggcagag acgtcaacag 3840
 gtcgccgagc atgacagaca gcttcaatc tggcggaaac agctcgcaga ctgctcgcgg 3900
 gccaaagctgc ccaccgattt cccccgacca cccttgctgt ccggcgacgc tggcagcgta 3960
 ccggtggaga tttcgggcca gctgttccaa aagctgcaca ggttctgcaa cgtgaccagc 4020
 acgaccccggt ttgccgtgct tctggcccggt tttcgtgctg cgcattaccg actcaccggg 4080
 gtcgacgacg ccgtcgtggg cacgcccatt gccaaaccgga accggcccga gctggagcgc 4140
 ctgattgggt tctttgtcaa cacgcaatgt atgcgcatca ccgtggacga tgatgatata 4200
 tttgagggct tggtagccca agtccgtagg acaacgactg aggcttttga aaacgaagat 4260
 gtcccccttg aacgcgtcgt gtccgccatg ctaccggcag gaggaggatc cagagatttg 4320
 tcccagacgc ccctggcaca gctcatcttt gccgtgcact cgcaagaaaa tctaggcaag 4380
 tttgagctag aaggtctcga gtcggaacct gttgcgaaca aggcatatac gcgctttgac 4440
 gctgaatttc acctgttcca aactcgtgac ggattaaacg gctacttgaa ctttgcccg 4500
 gaattgttca agctagagac gatgcaaaat gtcgtcagcg tcttcttaca gattctacgc 4560
 catggactgg agcagcctaa atccttgata tccgttttgc cgcttactga cgggttaaag 4620
 gagctcgaca gcatgggcct cttgaagatt catcgggggc ttgaatatca gcgagactct 4680
 agcctagtcg acatcttccg cagccaggtt gctacttgtc ctgatacaat tgccgtcatt 4740
 gactcatcag cacgtctgac gtatgctcag ctggaccatc agtccaacct actcgaggcc 4800

ES 2 682 743 T3

tggattcgcc gcaaaggctt gccggccgaa tcattggttg gcgtgctttc accgcggtcc 4860
 tgcgagacaa tcatcgctt tcttggtatt ctcaaagcaa acctggcata tctgccgctt 4920
 gatccaaaat cccctgtctc tcgtatgagg gacgtcctgt ccgatttacc aggtcacaca 4980
 atcatcctgc ttggctccga cgtggccgcc cccgaccttg agctaccttg tttggagctc 5040
 gtacgcattt ctgacgcctt gaaatctggt gcaagcgcag tcaatggcag tgagacgaca 5100
 gacttgctcg ctcogtcggc gaacagtctt gcatacgttt tgtacacgtc agggctcgact 5160
 gggcgaccaa agggagtcac ggttgagcac cgtgctattg tacggcttgt gcagcgcggc 5220
 gtgataccaa actttccccc gttgcgagga gcaatcatgg cacatctctt caataccgtc 5280
 tttgacggcg cgacctatga aatthttctc atgcttttga acggcggcac gttggtctgc 5340
 attgactatc tgaccacatt gagccccaaa gcaactcgaac ccgtcttctt gagagaagga 5400
 atcaactgtg caatcatgac accagcgcgt ctttaagctgt atctagccaa tgcccgcgat 5460
 ggcttaaag gactcgacat gctcatggtc gctggagacc ggctcgatcc gcaggacgca 5520
 gtcgagcac agactctggt ccgcggtgac tgctacaacg cctacggccc gaccgagaat 5580
 ggagtcatga gtactctgta caaaattgat acaagtgact ccttcatcaa cggcgtccct 5640
 ctaggtcgcg ctatagacaa ctctggagcc tacattaccg acccaaatca gcagcttgtc 5700
 ggccccggcg ttttgggaga gctcatcgtc accggagacg ggctcgcctc ggggtacacg 5760
 gaccagcac togacagaga ccgattcgta caagtgcgca tcaacggcga gtctgtcaga 5820
 gcatacggga ccggagaccg catgcgctac cgcgcaggcc aagattgtct ttcgaattc 5880
 tttggacgca tggactttca attcaagatt cgaagcaacc gcacgcagtc ggccgaggtg 5940
 gaagctgcca ttctcagtc tctctggtt cgcgatgcag ccattggtgt tgttggtgtc 6000
 caagaggaac aagagccaga aatggttggg ttcggtgttg ctgctgacga tgccgttgag 6060
 caagaggcca cagacaacca agtcgagggg tggcaagaac tgtttgagag tagcatgtac 6120
 aacggcatcg atgcaataag cccgtctgct ctccgcaagg actttacagg gtggacgtcc 6180
 atgtacgatg gaagtgaat cgacaagtcg gagatgcagg agtggctcga cgatacgata 6240
 catactctac ggcacgggtc tgtaccgggg catgtcctgg agattggaac cggtaacagg 6300
 atgatcttgt ttaacctcgg ctctgttgag agctacgtag gtctggaacc caccaagtcc 6360
 gcggtcgagt ttgtcaacaa ggccatcaag accctgcca atctcgcagg aaggcccgag 6420
 gttcacactg gcaaccgcc agatctgac cagctgagcg gactgcggcc agacctgtt 6480
 atactaaact ctgtggttca gtactttccc acagtagaat atctgacacg ggttggtgac 6540
 gctctggtcc ggatacgcgg cgtcaaacgt ctcttctttg gtgatgtgcg atcacaggcg 6600
 ctacacagac agtttcttgc tgcctgtgcg atgcacgcac taggcaagac ggcgaccagg 6660
 gacgacgtgc ggagatacat ggcagagcgg gaggagcggg aggaggagct gctcgtcgag 6720

ES 2 682 743 T3

ccagcctttt tcacagcact catgaaccgg catcccaatc tgatccagca cgtcgagatt 6780
 ctgcccaga atataagggc cacaaatgag ctgagcgcac accgttatgc agccgtcgtc 6840
 catctacgtg atccggagtc tgcggcggc cgggtgtatc cgattgcggc agacgactgg 6900
 gtcgactttc aggcctccca gatgcgcagc gacgtccttc gagaatacct gcgtctctcg 6960
 gccggtgccg ataccgtagc tgtctgcaat attccgtacg aaaagaccat ctttgagaga 7020
 ctgattgtcg agtcacttga tgacaacacc ggcagtgacg cgccacagag taggctgcat 7080
 ggcaggtcac tagatggcgc gccctggata tccgccgtcc gctccgacgc cgagagccgg 7140
 gcatccctct ccgtgccgga ccttgtgcag ctagccggcg agtctggctt ccaggtacag 7200
 gtgagtgccg cagcagcagc gtcgcagagc ggcgcgctgg acgccgtctt ccaccgccgc 7260
 cacgcgtcgt cctctcagcc gactatgcgc aactctctcc aattccccga cgacaatgca 7320
 ctgcgagctt cggtaccct gacgaaccgg ccgctgcagc ggctgcagag acgtcgcgtc 7380
 gcggcgcaga ttgcgaacg gctgcagacg ctggtgccgt cgtacatgat tcctgccaaag 7440
 attgtggtgc tggaccagat gcctctcaac gccaatggca aggtcgaccg gaaggagctg 7500
 gctcgtagag cccggacgac gacgatgacg aagaaaaaga agccgcagcg attggcgtcg 7560
 gagccagctt gtccaatcag cgacattgag gttgactgt gcgaggaggc cacggcaacg 7620
 tttggaatgc aagtcggcat cagcgatcac ttttcaaac tcggcggta ttctctgctt 7680
 gctacaaaac tcatatcccg cgtcggcgc agactgaaag cgcgcctgac ggtcaaggat 7740
 gtctttgatc acccaatctt ttccgagctt gcgattgtca tacgcgaggg gctgcaaaaac 7800
 gtcgtgcccg tggctttgaa tgggtggtgga caagcgaagc aagggtcggc gggagtagta 7860
 gcgccgcgca atgaaatgga aacgatgctg tgtgaggagt ttgccaatgt ccttggcatg 7920
 gatgtcggag tcacggacaa cttttttgac ctcggtgggc attcgcctcat ggcgacaaaag 7980
 ctggcagcgc ggattgggcg tcgattgaat actacgatat cagtgaagga ggtctttgaa 8040
 caccgattg tgtttcagct cgccaattcc ctgagctgg gtcagttgga gagcgacaga 8100
 gtaaagcaca caatgttggc cgattacact gcgtttcaac tcttgtctgt tgaagattg 8160
 caaggctttc ttcaaacga gataagccct caacttgaat gtgcacatgg cgttattcaa 8220
 gatgtatata cagccacgca tatgcaaaaag gcgtttttat gcgacgcgtc aaccggacat 8280
 cccaagcctc ttgtgccgtt ctacattgac tttccccccg actcagactg ttctactctg 8340
 gtcgaggcgt gctcatctct ggtgaagcgt ttcgacatgt tcaggacagt ggtcgtggaa 8400
 gctgcaggcg aactgtatca agtcgtttta gagcactttg atctacagat tgatgtcgtc 8460
 gagacggagg aaaacgtcca cgcggcgcg aacgatttcg tggacagaat cttggaggtg 8520
 cccgtccatc tcgggcaacc actgatataa ttcaccattc tcaagcaggc gtcttcagta 8580

ES 2 682 743 T3

cgagtcttgc	tttgtctttc	tcacgccttc	tatgatggct	tgagtttggg	gcacgtcgtg	8640
cgcgatctgc	acatgcttta	caaaggccgg	tccctgctgc	cagcgaatca	gttctcacgg	8700
tacatgcaat	acatggacca	cacgcgcaaa	gccggctgtg	acttttggcg	cgatgtcata	8760
caagatacgc	caatcactgt	cctcggccat	gtcogatgctg	gtggccgtga	gctagaagtg	8820
gaagcagcgc	ggacattgca	cgcgacaaa	attattagca	ttcctctgca	ggctgtccgc	8880
agcagcatca	ttacgcaggc	gacagtcttc	aacgctgcct	gtgctctcgt	gctgtctcga	8940
gaaaccggcg	ccaaggacgt	cgtgtttggc	cggatcgtgt	cggggcggca	aggcctgccg	9000
gtgagctggc	aaaacattgt	cgggcccgtg	accaatgccg	taccggtgcg	cgccccgatc	9060
atcgacgacg	acgacgacaa	ccaccggcag	atgctccgcg	acatgcaaga	ccagtacctc	9120
ctgagcctgc	cgtttgagac	gctcgatfff	gacgaggtcc	gacgcagctg	cacaaactgg	9180
ccggcgacgg	ccaacaacta	cgcgtgctgc	gtgacgtacc	acgacttttc	ataccacca	9240
gagagcgaga	tggagcagca	gcggtcagag	atgggcgtgc	tggccagaaa	ggatgcgctg	9300
ctcaaggagg	agcccgtgta	cgacctgggc	atcgcaggag	aggttgagcc	ggatggcgtg	9360
cacttgcaag	ttaccgtggt	cgcaaagacg	aggctgttta	gtgaagagag	ggccgcatac	9420
ctgatggaag	aggtgtgtag	actgtttgag	agtctaaact	cggctttgtg	a	9471

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de al menos un péptido no ribosómico, (NRP), o uno marcado isotópicamente, comprendiendo el procedimiento la etapa de expresión heteróloga de al menos una sintetasa de péptido no ribosómico (NRPS) de dicho péptido no ribosómico en el hongo filamentoso *Aspergillus niger*,
 5 en el que la NRP sintetasa es una ciclodepsipéptido sintetasa seleccionada de entre el grupo que contiene Enniatin, PF1022, Beauvericin y Bassianolide sintetasa,
 en el que se utiliza un sistema de expresión inducible integrado en el genoma del hongo filamentoso *Aspergillus niger* para la expresión heteróloga de la al menos una sintetasa, en el que el sistema de expresión comprende al menos un casete de expresión que comprende un primer módulo para la expresión constitutiva del trans-activador rTA2 dependiente de tetraciclina, un segundo módulo que alberga el promotor dependiente de rTA2 para la expresión inducible de la al menos una sintetasa secundaria de un metabolito y un tercer módulo para la integración del casete en el genoma fúngico por recombinación homóloga o heteróloga utilizando marcadores de selección apropiados.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la NRP sintetasa comprende módulos y/o dominios de al menos dos ciclodepsipéptido sintetasa diferentes.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la NRP sintetasa comprende el módulo 1 de una ciclodepsipéptido sintetasa y el módulo 2 y el dominio PCP/C de otra ciclodepsipéptido sintetasa.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el casete de expresión comprende genes adicionales que codifican las enzimas biosintéticas de los precursores metabólicos o intermediarios metabólicos.
 20
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** los genes adicionales codifican deshidrogenasas.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el medio de cultivo utilizado para la expresión heteróloga de la sintetasa comprende partículas de talco, titanio, sílice u óxido de aluminio.
 25
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el medio de cultivo utilizado para la expresión heteróloga de la sintetasa comprende 5-20 mM de al menos un ácido hidroxicarboxílico y 10-30 mM de al menos un aminoácido.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el medio de cultivo utilizado para la expresión heteróloga de la sintetasa comprende al menos un ácido D- o L-hidroxicarboxílico de fórmula general $R^1\text{-CHOH-CO}_2\text{H}$, en la que R^1 se selecciona de entre el grupo que comprende
 30
 - un $C_1\text{-C}_{50}$ -alquilo sustituido y no sustituido, $C_2\text{-C}_{50}$ -alqueno sustituido y no sustituido, $C_2\text{-C}_{50}$ -alquino sustituido y no sustituido, $C_3\text{-C}_{10}$ -cicloalquilo sustituido y no sustituido, $C_5\text{-C}_7$ -cicloalqueno sustituido y no sustituido, que en cada caso puede estar interrumpido por uno o más átomos de oxígeno, átomos de azufre, átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos, enlaces dobles y/o por uno o más grupos del tipo $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ y/o $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$
 35
 - arilo, heteroarilo, $-\text{CH}_2\text{-arilo}$ o $-\text{CH}_2\text{-heteroarilo}$, en el que el arilo y heteroarilo están sustituidos o no sustituidos.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el medio de cultivo utilizado para la expresión heteróloga de la sintetasa comprende al menos un D- o L-aminoácido de fórmula general $R^2\text{-CHNH}_2\text{-CO}_2\text{H}$,
 40 en la que R^2 se selecciona de entre el grupo que comprende
 - un $C_1\text{-C}_{50}$ -alquilo sustituido y no sustituido, $C_2\text{-C}_{50}$ -alqueno sustituido y no sustituido, $C_2\text{-C}_{50}$ -alquino sustituido y no sustituido, $C_3\text{-C}_{10}$ -cicloalquilo sustituido y no sustituido, $C_5\text{-C}_7$ -cicloalqueno sustituido y no sustituido, que en cada caso puede estar interrumpido por uno o más átomos de oxígeno, átomos de azufre, átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos, enlaces dobles y/o por uno o más grupos del tipo $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ y/o $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$
 45

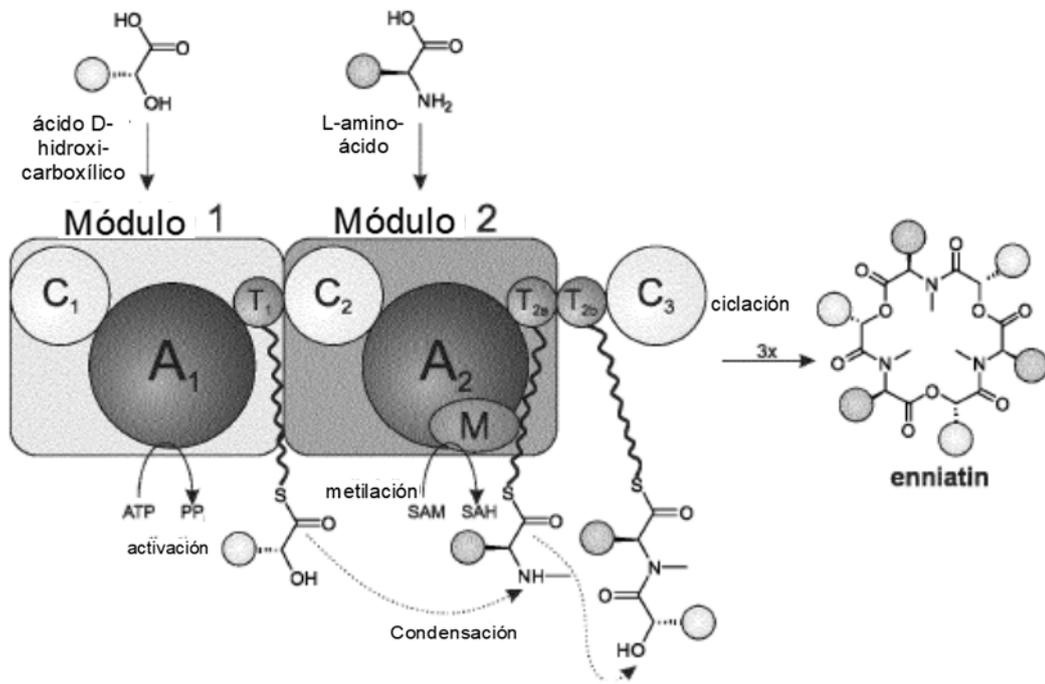


Figura 1

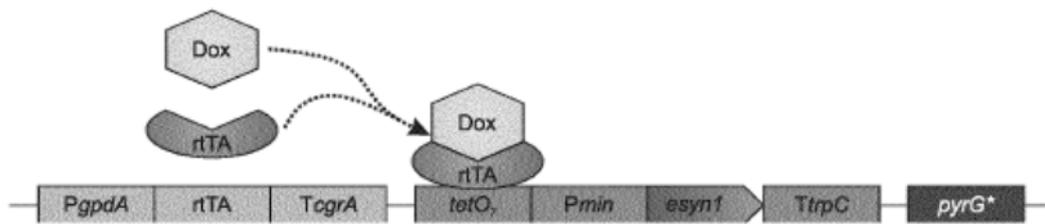


Figura 2

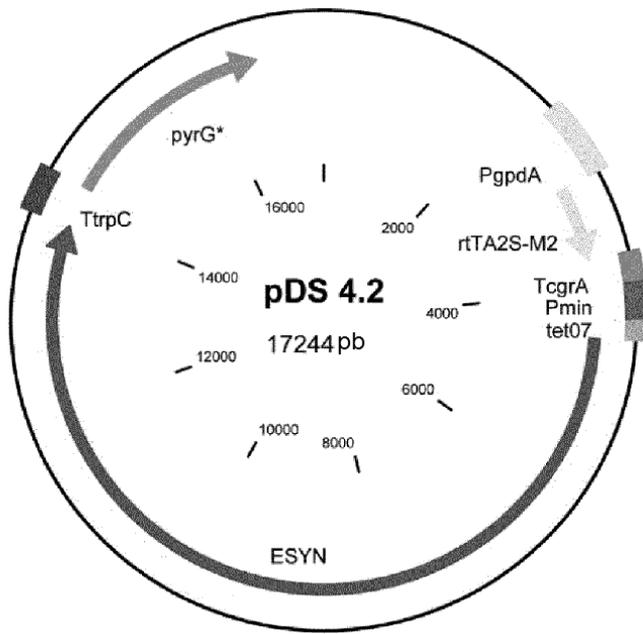


Figura 3

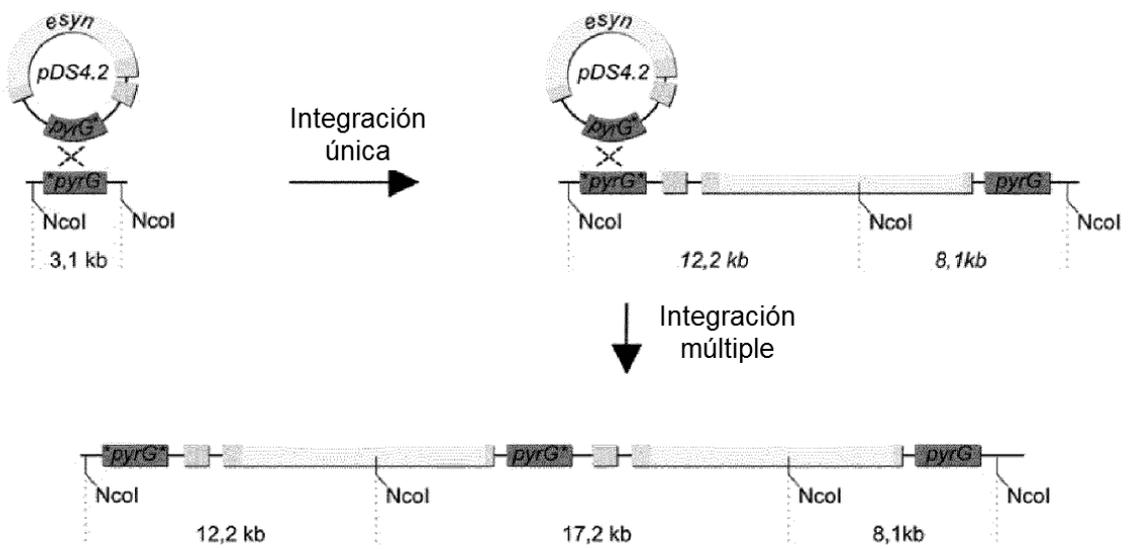


Figura 4

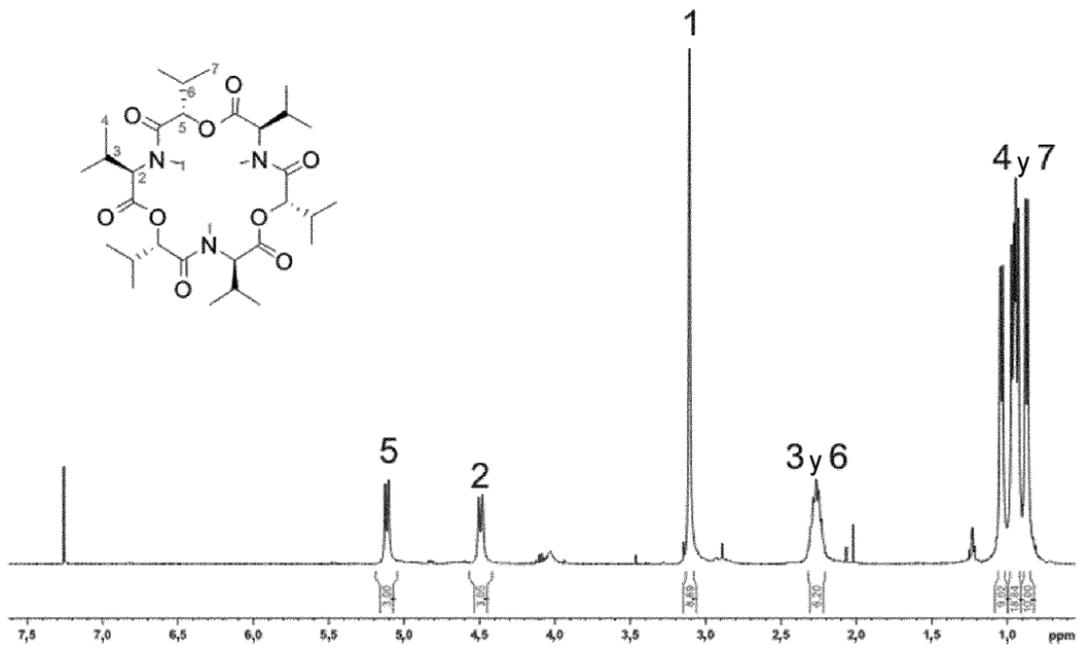


Figura 5

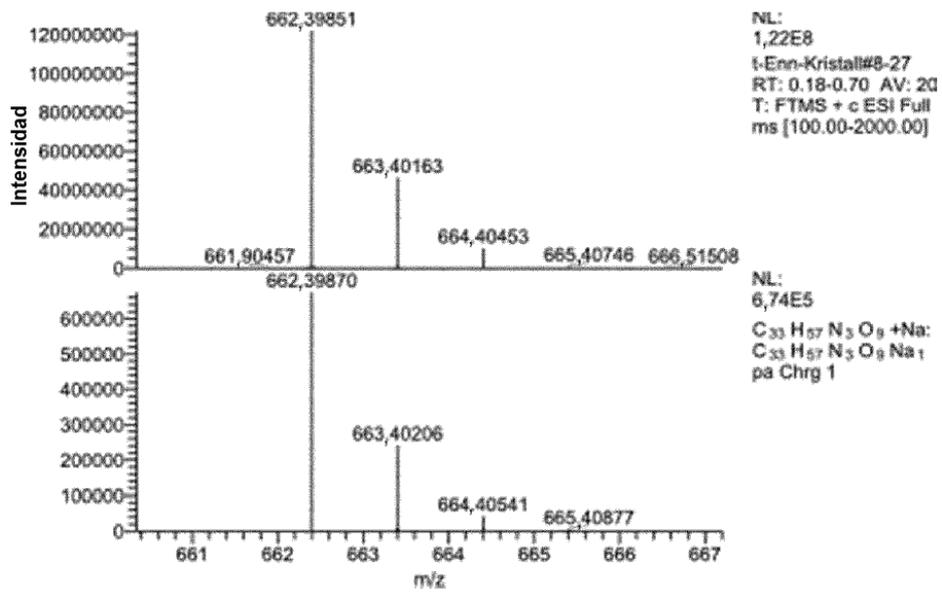


Figura 6

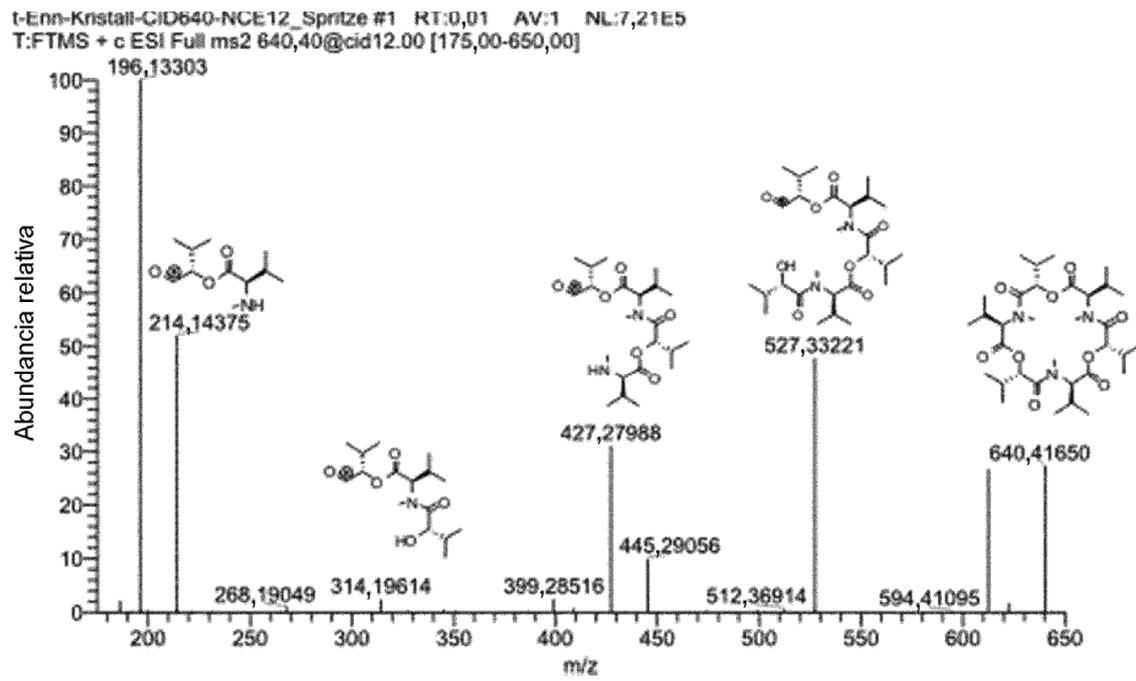


Figura 7

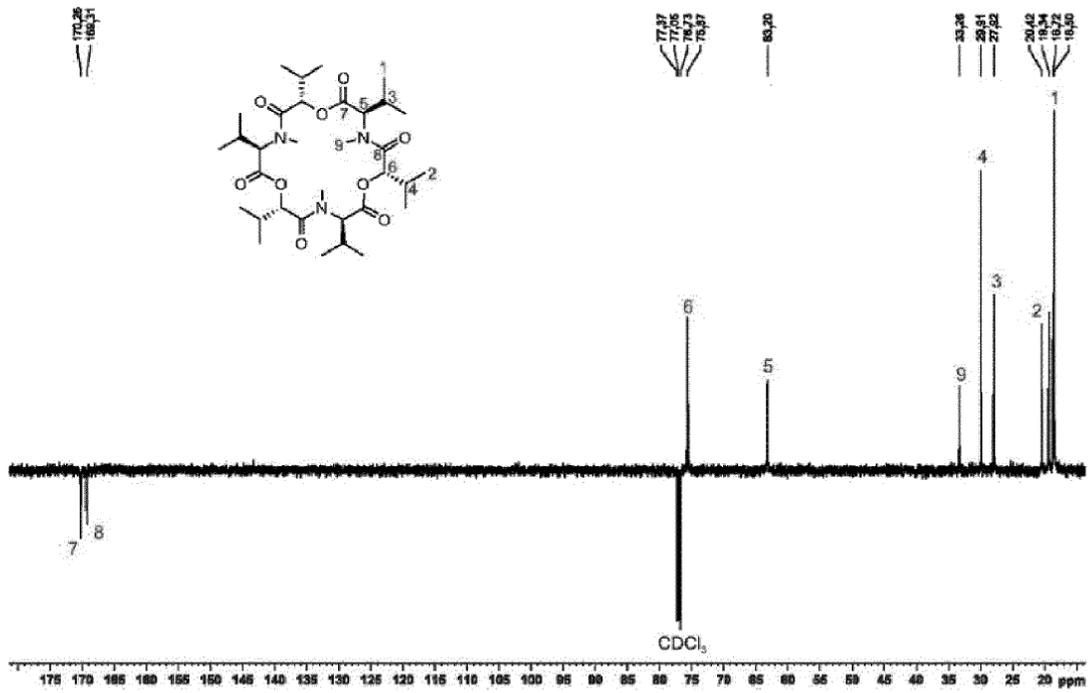


Figura 8

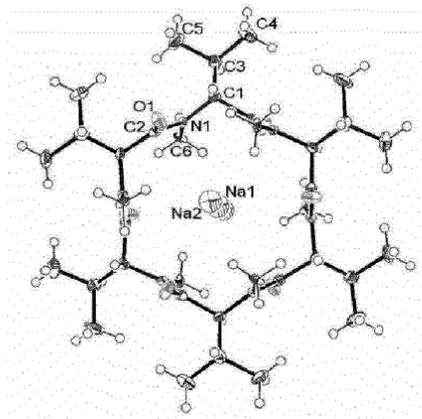


Figura 9

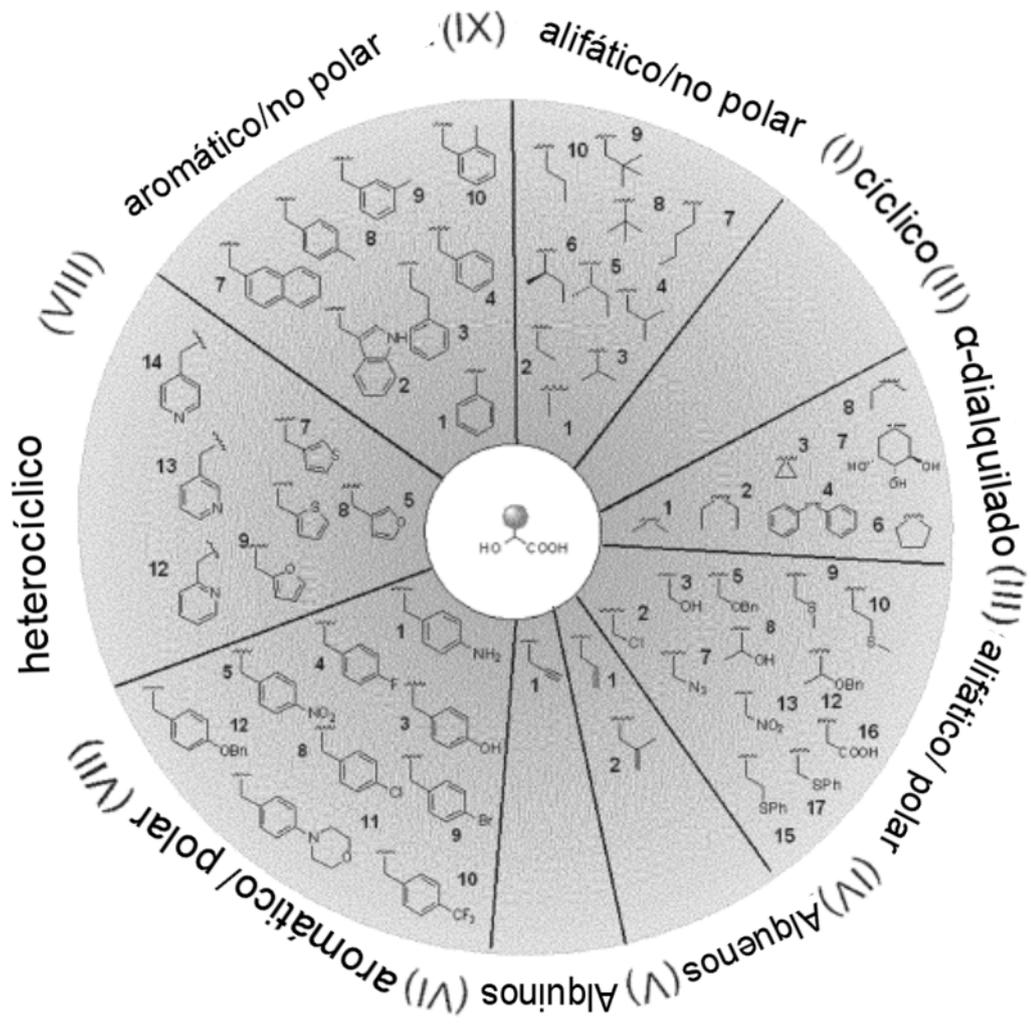


Figura 10

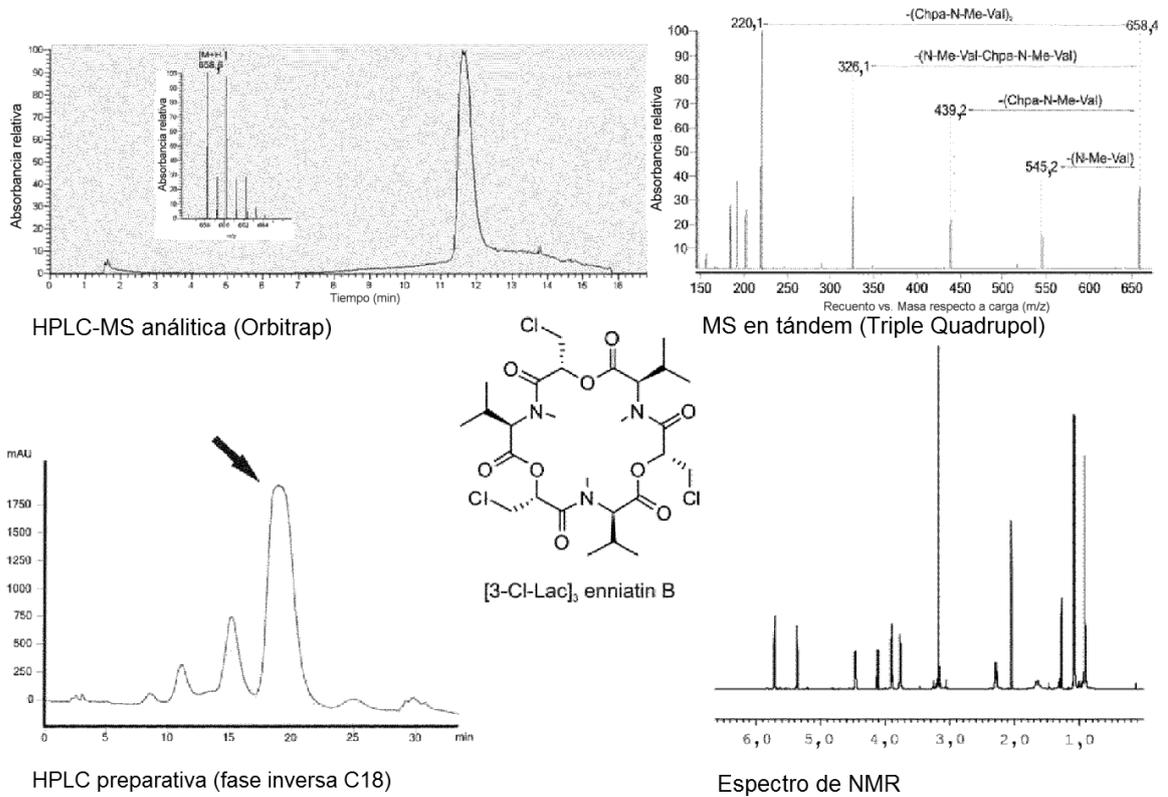


Figura 11

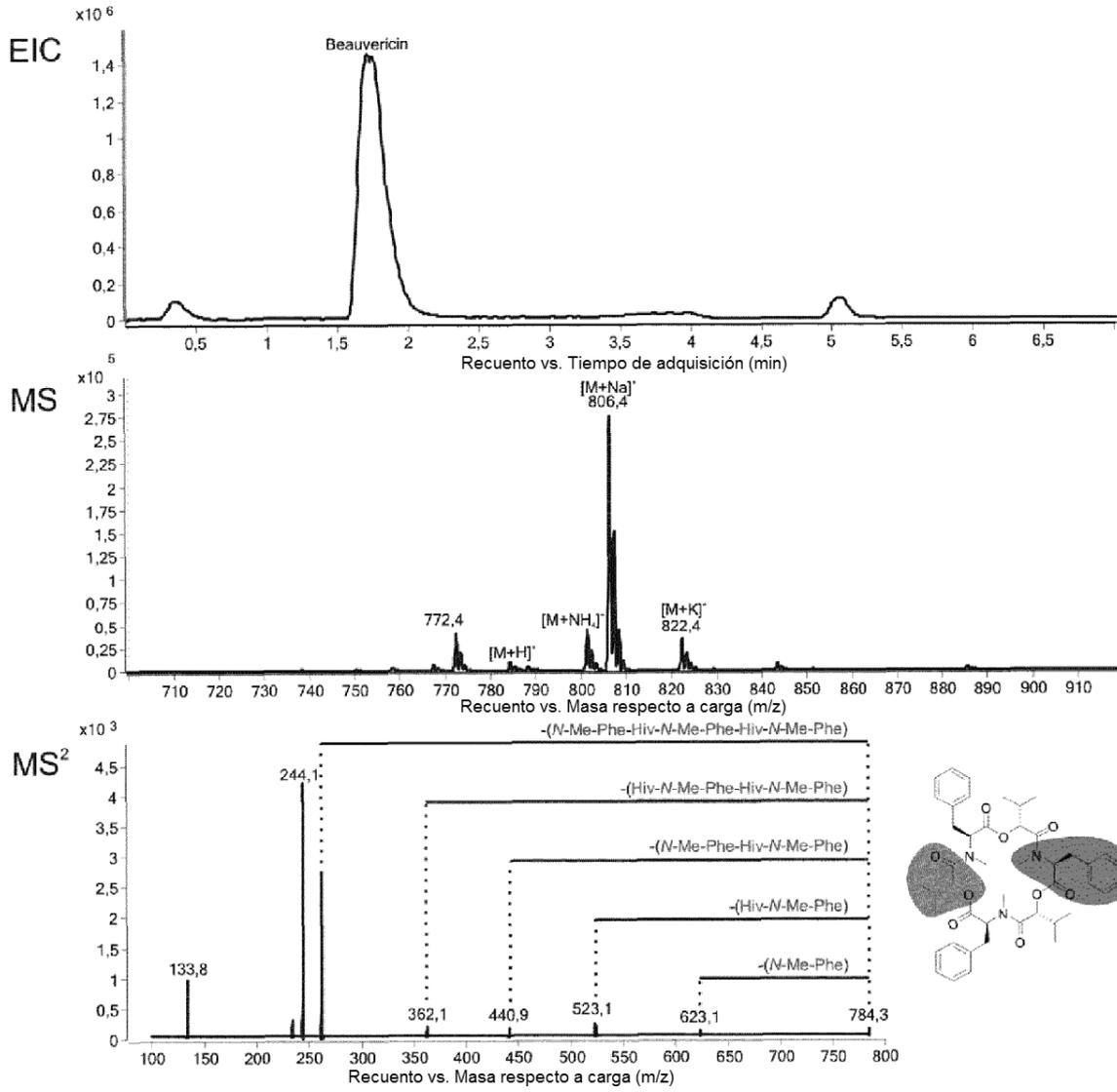


Figura 11a

Estrategia de intercambio - Recombinación en *E. coli*

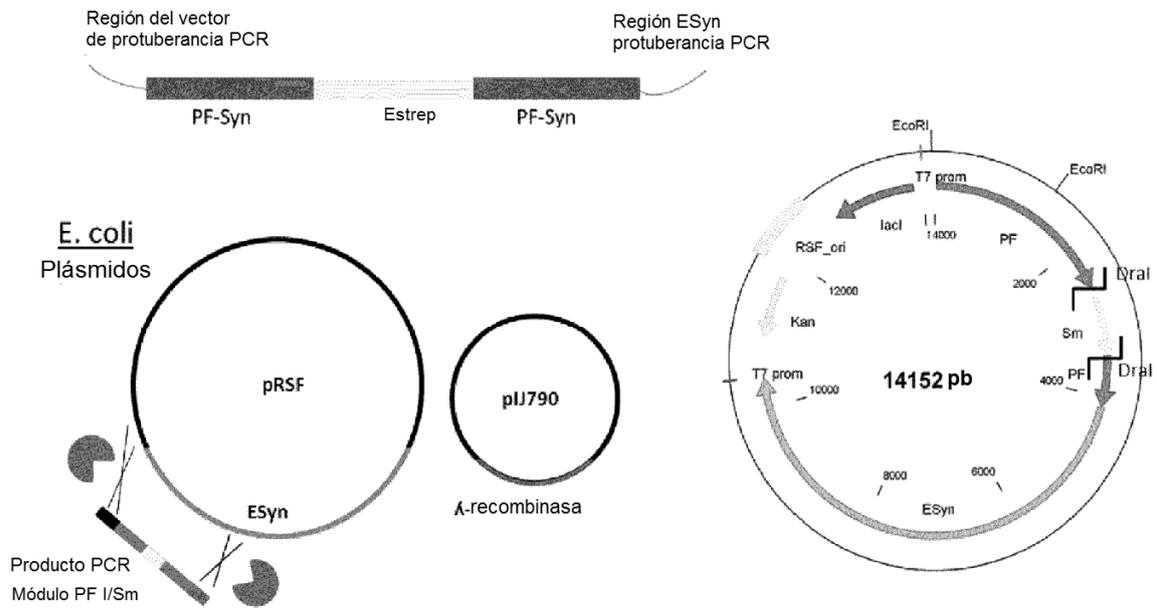


Figura 12

Motivo del núcleo - región de intercambio

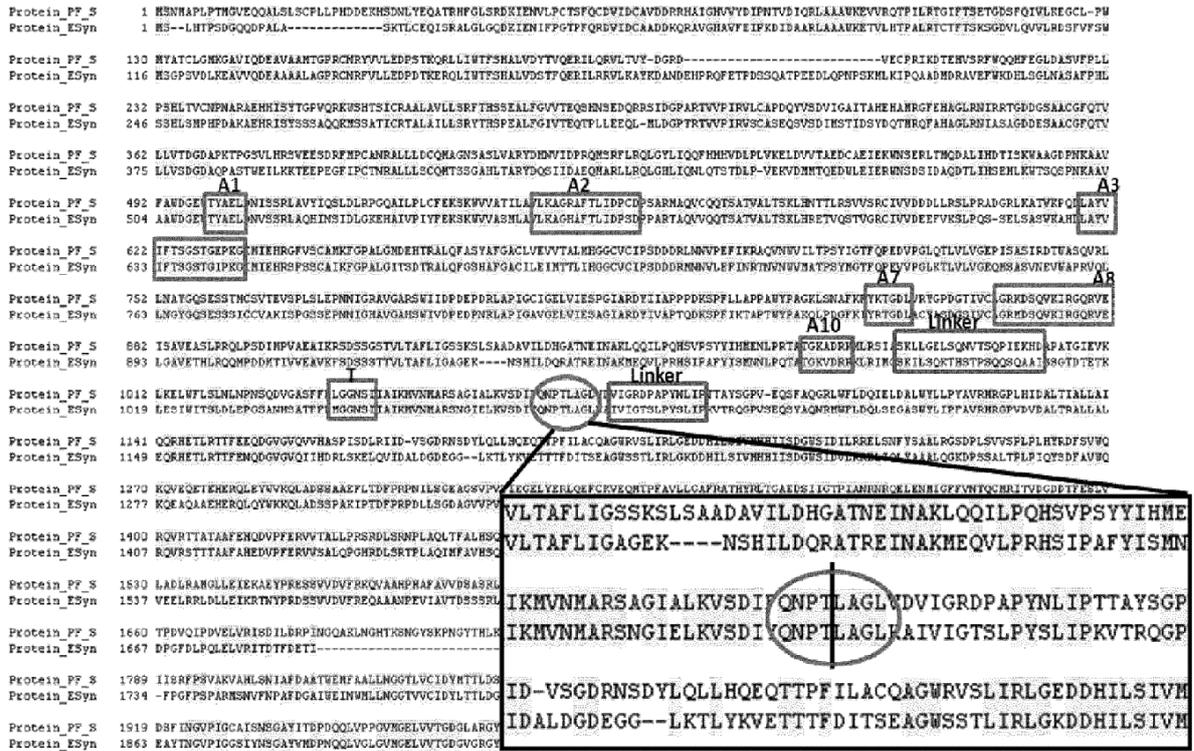


Figura 13

Ciclodepsipéptidos - Intercambio de módulos

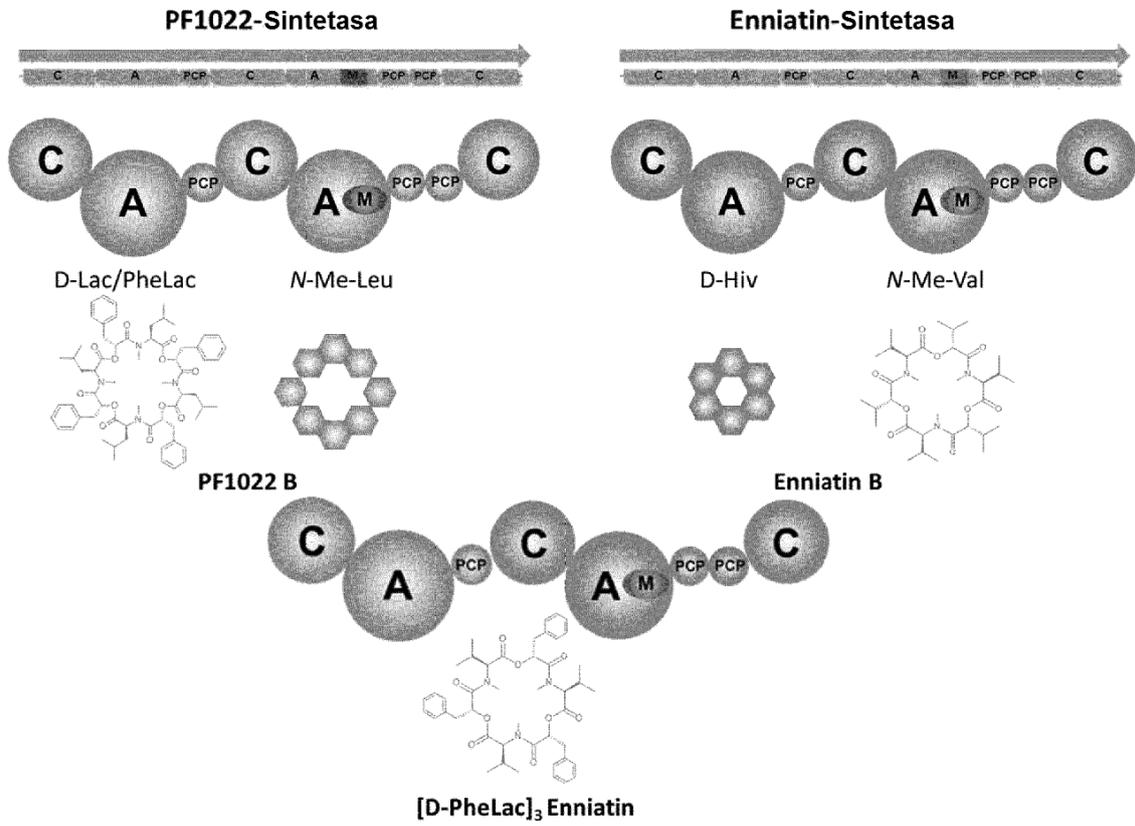


Figura 14

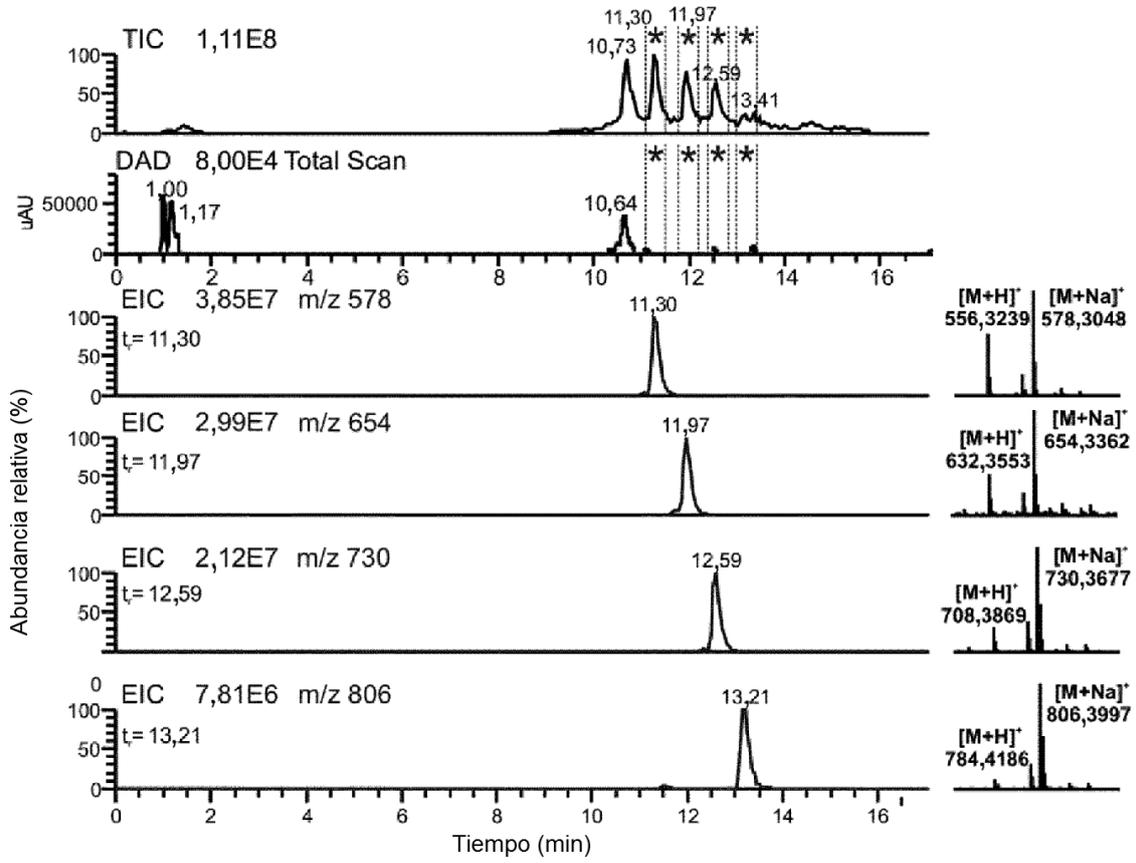


Figura 15

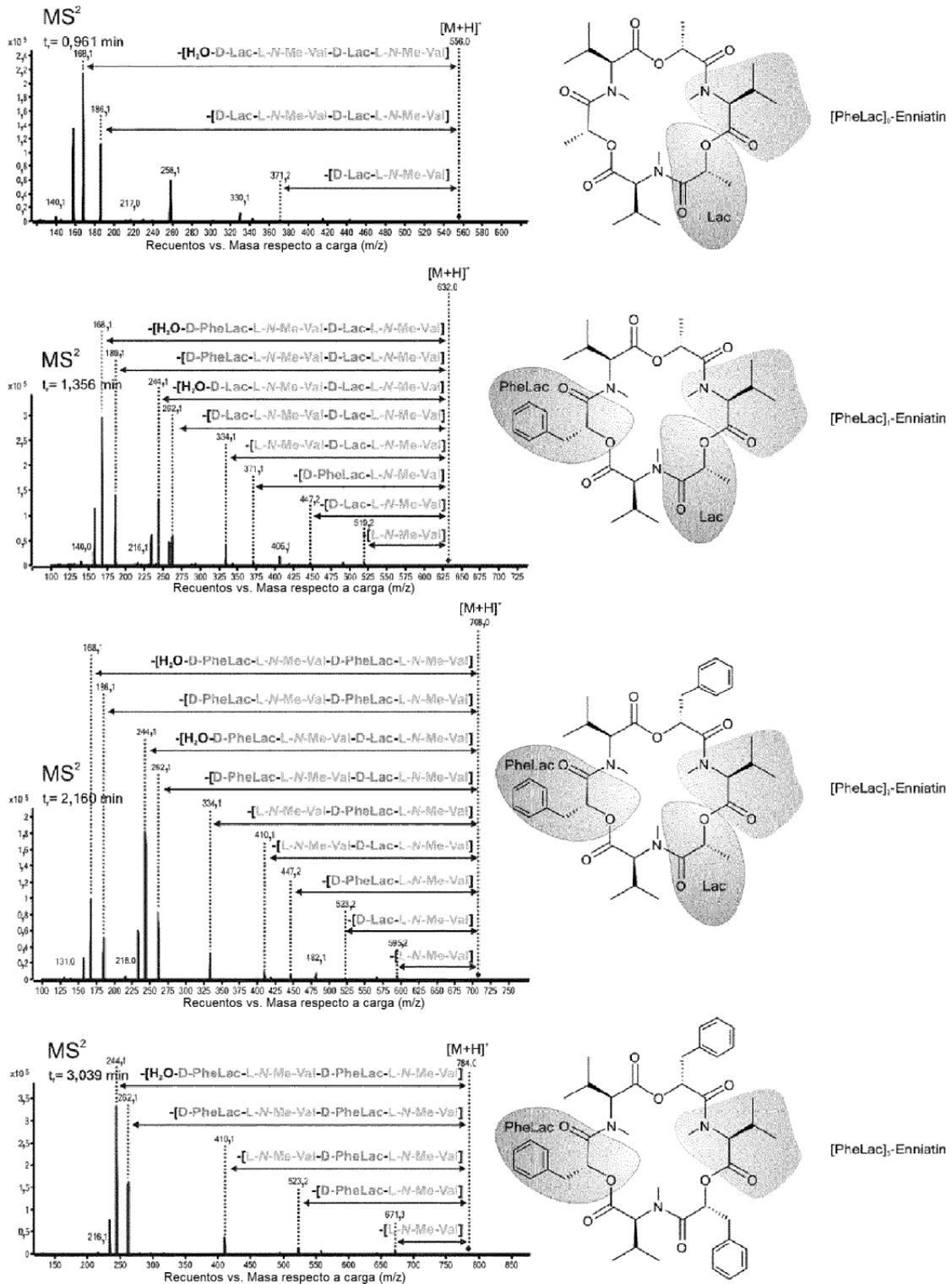


Figura 16

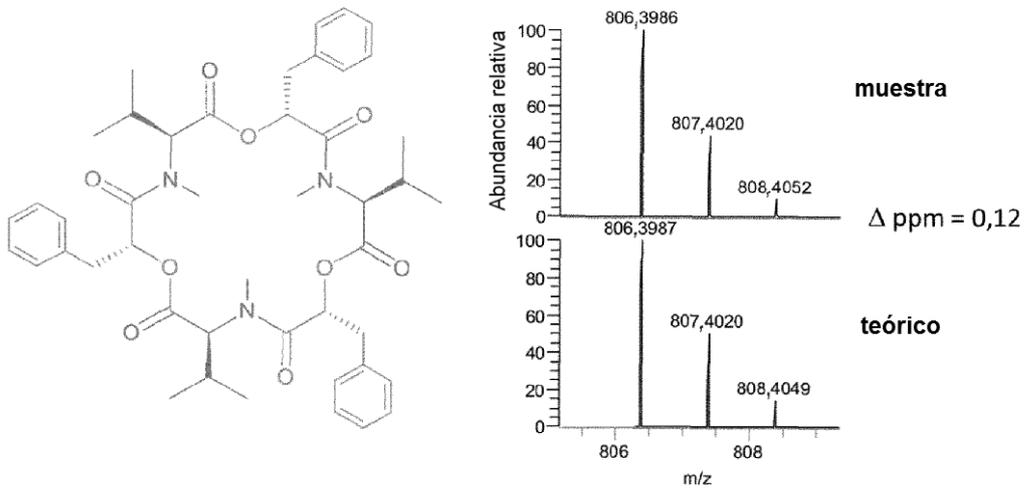


Figura 17

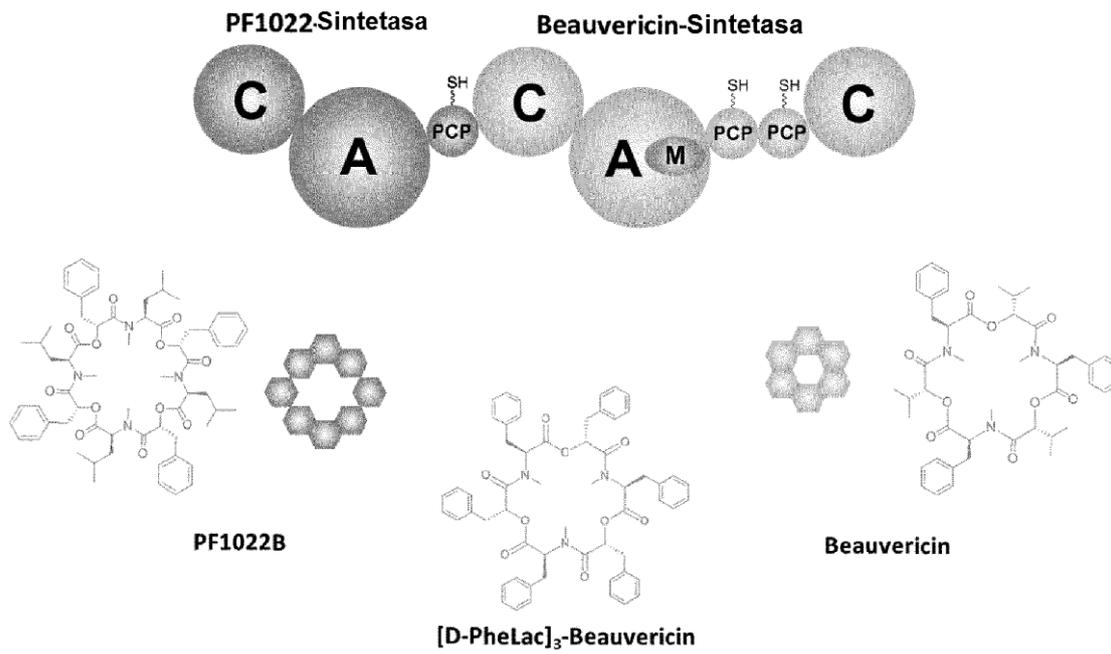


Figura 18

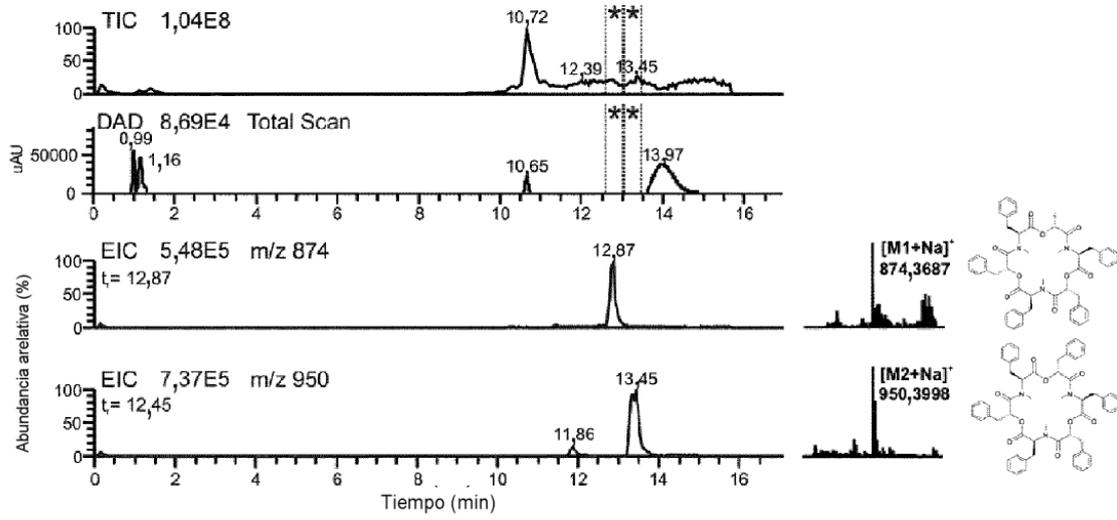


Figura 19

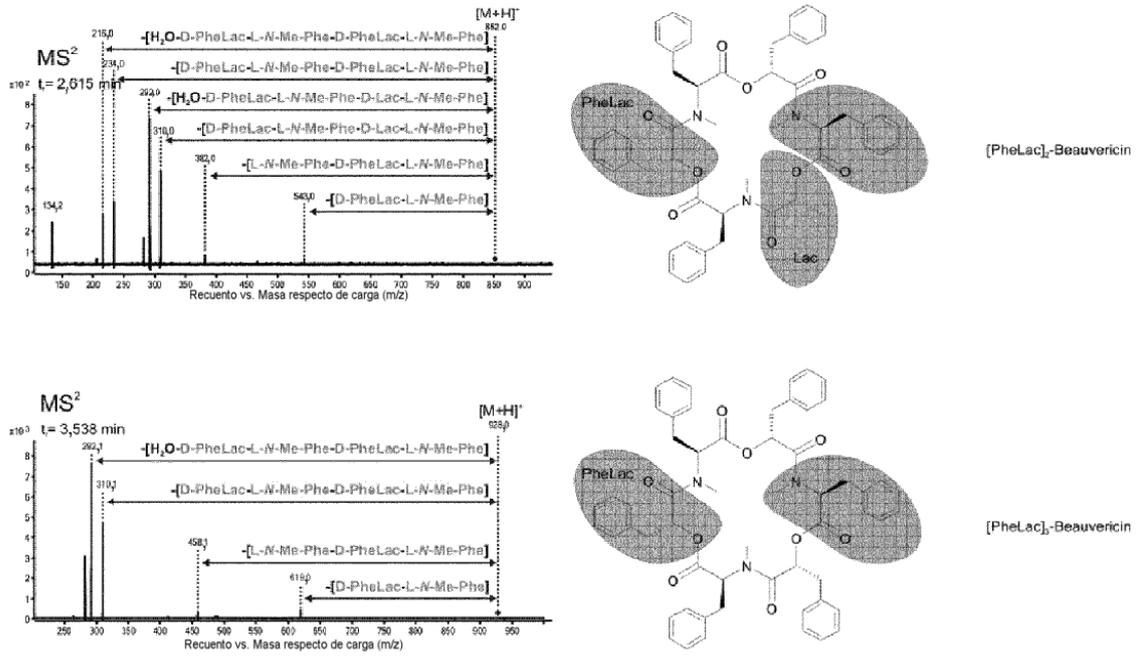
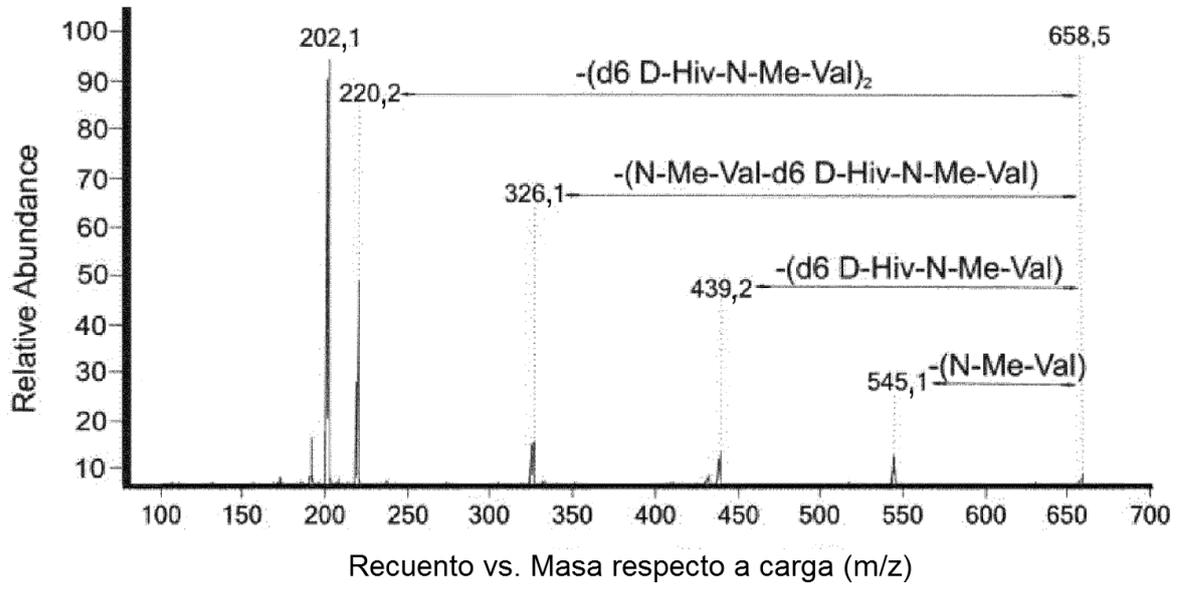


Figura 20



Abundancia relativa

Figura 21

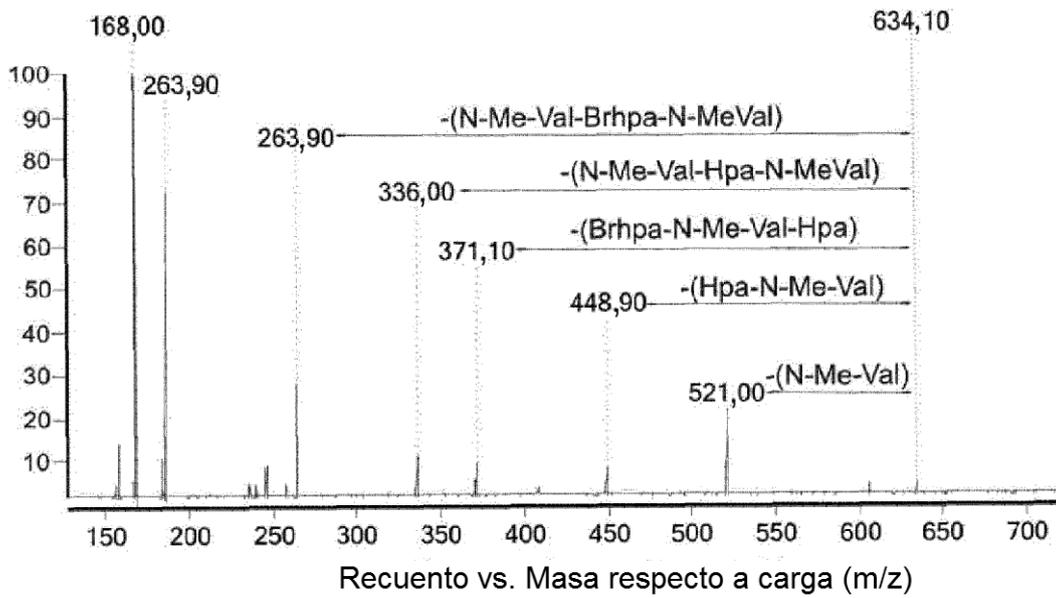
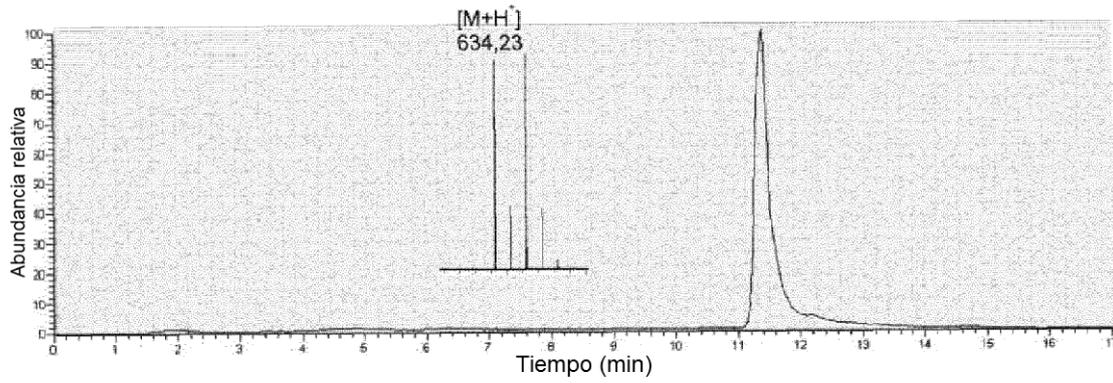


Figura 22

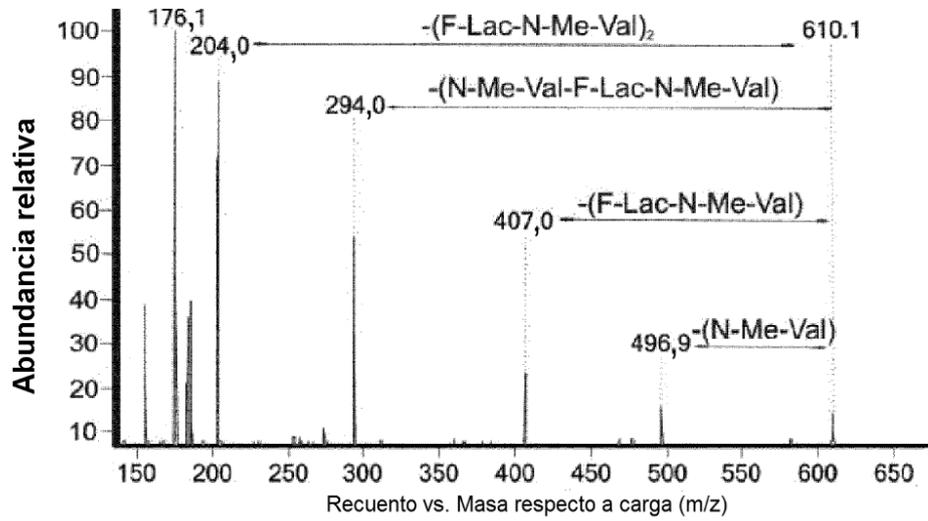


Figura 23

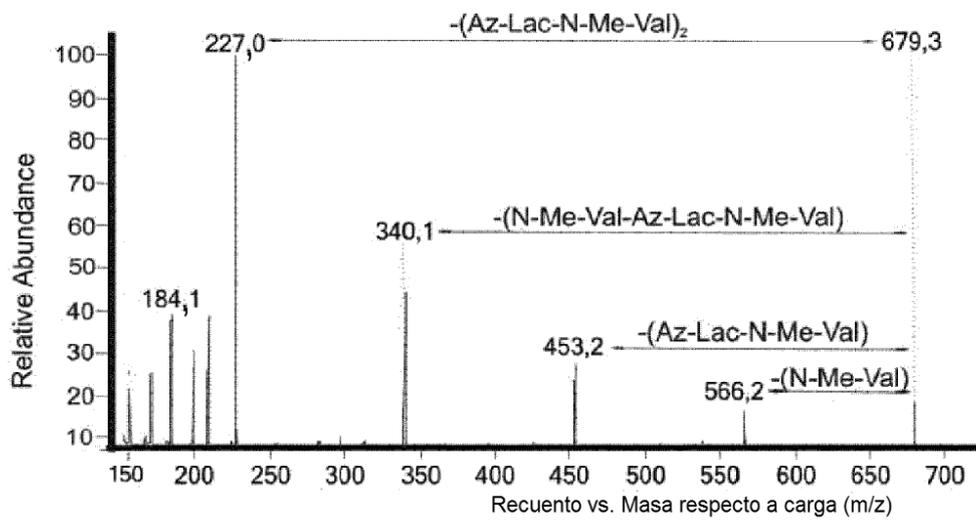


Figura 24

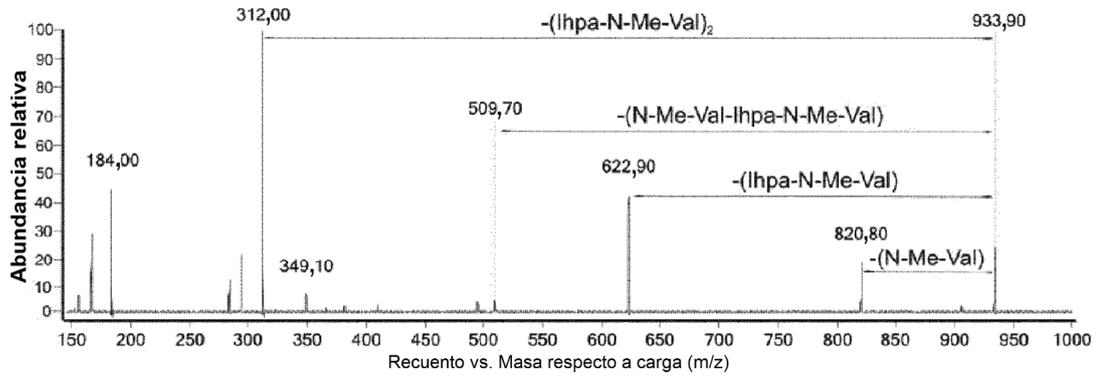


Figura 25

Seq ID No 1

Sintetasa quimérica PF/Enniatin

>PF/ESyn

ATGTCAAACATGGCACCCTCCCTACGATGGGCGTTGAGCAGCAAGCCCT
ATCACTTTCATGCCCTTACTCCCTCATGACGATGAGAAACTCAGACA
ACCTTTACGAGCAAGCAACTCGGCACCTCGGCTTGGCCGAGACAAGATC
GAAAATGTCTTACCATGTACTTCCCTTCAATGTGATGTCATAGATTGCGC
CGTCGACGATCGGGCGCATGCTATCGGTCACGTCGTCATGATATCCCA
ATACAGTGGACATCCAGCGTTAGCCGCGCAGCTGGAAAGAGGTTGTGCGG
CAGACACCAATCTTGAGGACCGGCATCTTACATCAGAAACCGGCGACTC
TTTTAGATCGTCTTGAAAGAAGGCTGCCTACCGTGGATGTACGCGACAT
GTCTCGGCATGAAGGGGCGAGTATACAAGATGAAGCAGTCGCGCTATG
ACTGGACCGGTTGCAATCGATATGTCGTCCTGGAGGACCCGAGTACGAA
GCAAAGGCTGCTCATCTGGACATTCAGCCATGCTTTAGTGGATTATACAG
TCCAGGAACGCATCCTTCAGCGGTTCTCACAGTATACGACGGCCGGGAC
GTCGAGTGCCTCGCATCAAGGATACAGAACATGTCCTCGGTTTTGGCA
ACAACACTTTGAAGGCTTAGATGCCTCCGTATTTCCCTTCTACCATCTC
ACCTAACTGTGTGCAATCCCAATGCGCGCGCAGAACATCATATCTCATA
ACGGGACCGTCCAGAGGAAGTGGTCCCATACAAGTATCTGTCGGGCTGC
ACTCGCAGTCTTCTATCTCGCTTTACACACTCTTCGGAGGCCCTCTTCG
GTGTTGTGACAGAACAATCTCACAACCTCCGAGGACCAAAGACGGTCAATT
GATGGCCCCGCAAGGACAGTAGTGCCTATCCGCGTCCTTTGTGCCCGAGA
TCAATATGTGTCGGATGTCAATTGGGGCAATCACCGCACACGAACACGCCA
TGGCGGGGTTGAGCAGCTGGACTTCGCAATATCCGCCGTACCGGAGAC
GACGGGCTGCTGCTGTGGATTCCAGACCGTGTACTGGTGACTGACGG
TGAIGCTCCCAAGACCCCTGGGAGTGTACTTCATCGAAGTGTAGAAGAAT
CGGATAGATTTCATGCCCTGCGCTAATCGTGCCTTCTGCTCGACTGCCAG
ATGGCTGGCAACTCGGCATCCCTAGTCGCACGATATGATCATAATGTGAT
CGACCCACGCCAGATGTCTCGCTTCTGCGACAGCTAGGATACCTGATCC
AACAAATTCATCATCACGTCGATCTGCCTCTGGTCAAAGAACTGGACGTC
GTGACGGCGGAGGATTGTGCGGAAATCGAGAAATGGAATTCAGAACGCCT
AACAAATGCAAGACGCCTTAATCCACGACACCATAATCCAAGTGGGCTGCTG
GCGATCCCAACAAAGCTGCAGTTTTCGCTTGGGATGGGGAATGGACATAC
GCCGAGCTAGACAACATATCCTCCCGTCTCGCCGTGTATATCCAATCCCT
GGACTTGAGACCAGGACAAGCAATACTCCCACTCTGCTTCGAGAAGTCAA

ES 2 682 743 T3

AATGGGTCGTCGCCACAATTCTCGCCGCTCCTCAAAGCCGGTCGGGCATTC
ACACTCATCGACCCGTGCGACCCCTCGGCAAGGATGGCCAGGTCTGTCA
GCAGACCTCCGCCACAGTCGCTCTCACCTCCAACTCCACAACACCACCT
TACGTTCCGTCGTTCCCGCTGCATTGTGGTCGACGACGACCTCCTTCGG
TCCTTACCCCGCGCGATGGCCGCTTAAAGGCCACCGTGAAGCCACAGGA
CTGGCCTATGTTATTTTACATCTGGCAGCACAGGAGAGCCGAAAGGCA
TCATGATCGAACATCGGGGGTTCGTGTCGTGTGCTATGAAATTTGGCCCC
GCGCTCGGAATGGATGAGCACACGCGCGCTCTTCAATTGCGCTCATATGC
GTTTGGCGCTTGCTGGTAGAAGTTGTGACAGCTCTGATGCACGGCGGCT
GCGTCTGCATCCCTTCCGATGACGATCGCTTGAACAATGTACCGGAGTTC
ATCAAAGGGCCCAGGTGAACTGGGTGATACTCACTCCGTCGTATATCGG
GACATTCAGCCGGAAGATGTCCTGGACTACAAACTGGTATTGGTTG
GACAACCTATCICAGCGTCTATTCCGGATACCTGGGCTCCAGGTTGGA
CTCCTGAATGCCACGGTCAGAGTGAAAGCTCAACTATGTGCAGCGTCAC
GGAAATCAGCCCGCTCTCCCTCGAACCGAACAATATCGGTGCGGCTGTAG
GCCACGATCCTGGATCATTGATCCCGACGAGCCTGATCGTCTTGCTCCA
ATTGGCTGCATTGGAGAGCTAGTGATCGAAAGTCCGGGCATTGCGCGCGA
CTATATCATCGCGCCGCGCCGACAAAGTCCCTTTCTCCTAGCACCCC
CGCCCTGGTATCCAGCCGGGAAATTATCCAACGCCTTTAAATTTTACAAG
ACTGGAGATCTCGTGCCTTATGGACCTGACGGCACCATCGTCTGCCTGGG
ACGCAAAGATTCCGAAGTGAAGATCCGAGGGCAGCGGTAGAGATCAGCG
CAGTGAAGCCAGTCTACGACGACAACCTACCTAGTGACATCATGCCCGTG
GCCGAAGCTATCAAACGCTCGGATTCGTCAAGGCAGCACAGTCTTACTGC
CTTCTTGATAGGGTCATCTAAGAGTTTATCTGCGGCAGACGCCGTTATCT
TGATCACGGTGTACCAACGAGATAAACCGGAAGTTGCAGCAAATCCTT
CCCCAGCATTCCGTTCCAICCTATTATATCCACATGGAAAATCTTCCTCG
AACTGCCACCGCAAAGCGGACAGGAAAATGCTTCGATCTATTGCTAGCA
AGCTATTGGGTGAATTGTCTCAGAACGTGACATCTCAACCGATTGAGAAG
CACGATGCCCCAGCAACTGGTATAGAGGTCAAGCTGAAGGAGCTTTGGTT
TCIGAGCTTGAATCTTAATCCCAACTCTCAAGATGTCGGAGCGAGTTTCT
TTGACTTAGGGGAAATTCATTATCGCCATCAAAATGGTAAACATGGCG
AGGTCAGCTGGGATAGCACTGAAGGTATCCGACATATTCCAGAATCCCAC
GCTCGCTGGTCTCAAGGCTATTGTCATTGGTACTTCGCTGCCATACAGCC
TTATTCCCAAGGTTACCCGCCAAGGCCCTGTTAGCGAGCAGTCTTATGCG
CAAAACAGAATGTGGTTCTCTGGATCAGTTGTCTGAGGGTGCTTCATGGTA
TCIGATTCCCTTTCGCTGTGCGCATGCCAGGTCCCGTGGATGTTGATGCGT
TGACGCGTGCTTTGCTCGCTCTTGAACAGCGTCATGAGACACTACGAACT
ACATTTGAGAACCAAGATGGTGTGGAGTCCAGATCATCCATGATAGACT

ES 2 682 743 T3

CTCCAAAGAGCTACAAGTCATCGATGCCTTGGATGGTGACGAGGGTGGTC
TCAAGACACTCTACAAAGTAGAGACCACCACATTCGACATCACATCCGAA
GCAGGCTGGAGCTCAACCCCTCATCCGCTCGGCAAAGACGATCACATTC
GTCTATCGTCATGCACCACATCATCTCCGACGGCTGGTCCATCGACGTT
TCGCGCGGAATCATCCAACCTACGCCCGCGCTCTGCAGGGCAAGGAT
CCTTCCTCCGACTAACCCCTTACCATCCAGTACAGCGACTTCGCCGT
GTGGCAGAAGCAGGAGGCCAAGCAGCTGAGCACGAGAGGCAGCTCCAGT
ACTGGAAGAAGCAACTCGCAGATAGTTCACCTGCCAAGATCCCTACCGAC
TTCGCCGTCCAGATCTCCTGTCCGGTGACGCAGGCGTTGTGCCCGTTGC
CATCGACGGCGAGCTGTATCAGAACTAAGGGCTTCTGCAACAAGCACA
ACAGCACTGCCTTCTCCATCCTGCTCGCTGCTTCCGCGCGGCGCATTAC
CGTCTCACAGCCGTTGACGACGCCGTGATCGGCATCCCCATTGCAAACCG
TAACCGCTGGGAGCTGGAGAACATGATTGGTTTCTTTGTCAACACGCAGT
GIATGCGCATCGCCGTTGACGAGACGGATACATTTGAGAGICTGGTGGC
CAGGTACAGATCTACCACIACAGCTGCGTTTGGCGCACGAGGATGTCCCTT
CGAGCGTGTGTTTTCAGCGCTTCCAGCCTGGCCATAGAGATCTCTCGCGAA
CACCGCTGGCACAGATAATGTTTGTGTTCACTCGCAGAAGGACCTTGGA
CGTTTCGAGCTGGAGGGIATCCAGTCTGAGCCTATCGCCAGCAAGGCCTA
CACCAGATTGATGTCGAGTTCATCTGTTCCAACAGGCAGACGGACTGA
AGGGCAGTTGCAACTTTGCCACAGATCTTCAAGCCCCGAACTATCCAG
AAIGTTGTCAGCGTGTTTTCCAGATTCTACGCCATGGCCTTGACCAGCC
TGAGACGTGATCTCGGTTCTTCCACTGACTGATGGAGTCGAGGAGCTTC
GCAGGTTGGATCTGCTGAAATCAAGAGGACTAACTACCCTCGCATTCG
AGCGTGGTAGATGTCTCCGCGAACAAAGCTGCCGCCAACCCAGAGTTAT
CGCTGTTACCGACTCATCTTCTCGTCTGACTTATGCAGAGCTGGACAATA
AGTCTGAGCTGCTCTCACGATGGCTTCGACGACGTAACCTTGACGCCAGAG
ACGCTGGTCAAGTGTCTTGTCTCCCGGCTTGGCGAGACTATCGTTGCCTA
TGTTGGTATCCTCAAGGCGAACCTGGCGTATCTTCCCTTGACGTGAGGT
CCCCGGTACTCGTATGAAGGACATCTTGTGAGCGTGTCTGGAAACACC
ATAGTTCTTATGGGCTCTGGGGTAGAGGATCCTGGCTTTGACTTACC
ACTAGAGCTCGTACGCATCACCGACACTTTCGATGAGACCATCGAGGACG
TGCAAGACTCTCCCCAACCGTCTGCCACAAGCCTCGCCTACGTCTCTTC
ACATCCGGTTCAACTGGTAAACCCAAAGGGCGTCATGATCGAGCACCGGGC
CATTGTGCGTCTCGTCAAGAGTGACAACCTTCTGGCTTCCCCTCCCCCG
CTCGCATGTCAAATGTCTTCAACCCTGCCTTGGACGGAGCCATCTGGGAG
ATCAACTGGATGCTCCTGAACGGCGGAACAGTCGTCGTCATCGACTACCT
GACCACCCTGGACGGCAAAGAGCTCGCTGCTGTGTTCCGCCAAAGAGCGCG
TCAACGCCCGCTTCTTCGCACCTGCGATGCTCAAGCTTTACCTCGTTGAT

ES 2 682 743 T3

GCGCGGAGGCTTTGAAGAATCTTGACTTCCTTATTGTTGGAGGTGAGAG
GTTGATACCAAGGAAGCCGTGGAGGCCATGCCGCTTGTGAGAGGCAAGA
TTGCCAATATCTATGGTCCGACTGAGGCTGGAATAATCAGCACGTGCTAT
AACATCCCCAAGGATGAGGCTTACACCAATGGTGTTCCCATTGGTGGAAG
TATCTACAACCTCTGGTGCCTACGTCAIGGATCCTAACCAGCAACTTGTG
GCCTTGGCGTCAATGGGAGAGCTTGTGTTACCGGAGACGGTGTGGTGC
GGCTACACTAACCCCGAGCTCAACAAGAACCGCTTCATCGACATCACCAT
CGAGGGCAAGACTTTCAAGGCTTACCGTACTGGTGACCGGATGCGTGCAC
GAGTAGGCGACGGTCTCCTTGAGTTCTTCGGCCGCATGGACAACCAGTTC
AAGATCCGCGGCAACCGTATCGAAGCAGGGGAAGTTGAGTCTGCCATGCT
CAGCCTCAAGAAATGTCCTTAACGCCGCCATTGTCGTCCGCGGGGGCGGAG
AAGATGAAGGGCCACTCGAGATGGTCGGATTCATCGTCGCGGACGACAAG
AATGATACCACGGAGGGAAGAGACAGGCAACCAAGTTGAGGGCTGGCA
GGACCATTTCGAGAGTGGTATGTACTCGGATATCAGCACCGCCGTGGACC
AATCTGCCATTGGAAACGACTTTAAGGGCTGGACTTCTATGTACGATGGT
AAGGATATCGACAAGGGCGAGATGCAGGAGTGGTTGGACGACGCTATTCA
CACCTGCATAACGGCCAGATCCTCGCGATGTCCTCGAGATCGGTACCG
GTAGTGGTATGATCCTGTTCAACCTCAACCCGGGCCTCAACAGCTACGTT
GGCTTGATCCATCCAAGTCAGCAGTCGAGTTCGTCAACAGAGCCGTGCA
GTCCTCTCCCAAGTTCGCAGGAAAAGCCAAGGTCCACGTCGGCATGGCCA
CAGACGTCAACAACTCGGCGAAGTACACCCGATCTCGTGGTCTTCAAC
TCCGTTGTTCAATACTTCCCAACCCGAGTATCTCGCCGAGGTCAATGCA
TGCCCTCATTGCCATCCCAGCGTCAAGCGCATCTTCTTGGCGATATCA
GATCATATGCTACCAACGGACACTTCTCGCCGCACGCGCCATCCACAG
CTCGGCACCAATAACAACGCCACCAAGGATAGGGTGCGCCAGAAGATCCA
GGAGCTGGAGGATCGAGAGGAAGATTTCTCGTTGAGCCTGCCTTCTTCA
CCACTCTGAAGGAGCGAGTCCAGATGTTGTCAGCATGTTGAGATCATC
CCCAAGAACATGAAGGCCACCAACGAACCTCAGCGCTATCGCTACACGGC
TGTGTGCATCTCGGGATGAAACGGACGAACCTGTGTATCATATTGAGA
AGGATAGCTGGGTGACTTTGAGGCGAAGCAGATGGACAAGACGGCTCTT
CTTGACCACCTGCGCCTCTCCAAGGATGCTATGAGTGTGGCGTTAGCAA
CATCACCTACGCCCACACTGCCCTTGAACGTCGTATCGTTGAGTCTCTCG
ATGAGGATAGCAAGGATGACACCAAGGGTACACTCGATGGTGCAGCCTGG
CTCTCAGCAGTTCGCTCCGAAGCCGAAAACCGCGCTCACTCACCGTCCC
CGACATCCTGGAGATCGCCAAAGAGGCTGGTTCCGAGTTGAAGTCAGCG
CTGCTCGCCAGTGGTCCCAAAGTGGTGTCTTAGACGCGAGTCTTCCACCAC
TTTCCACCTCCAGCACTGACCGCACTTAATCCAGTTCCCAACGGACAA
CGAGCTTCGATCATCACTCACCTCGCCAAACCGCCCTCTCCAGAAGCTGC

ES 2 682 743 T3

AGCGCCGTCGTCGCCGCTCTGCAAGTCCGCGAGAAGCTCCAGACGCTGGTC
CCCTCTTACATGGTTCCCTCCGAATATCGTGGTGCIGGACACGATGCCTCT
CAATACTAACGGCAAGATCGACAGAAAGGAGCTTACGCGTAGAGCACGAA
CACTGCCGAAGCAGCAGACTGCGGCGCCTGTGCCGGACTTCCCTATCTCT
GAIATCGAGATCACGCTGTGCGAGGAGGCAACTGAGGTCTTTGGAATGAA
GGITGAAATCAGCGATCACTTCTTCCAGCTCGGCGGTCACTCTCTCCTCG
CTACGAAACTCATTTCTCGCATCCAGCACCGTCTCCATGTGCCGGTTACT
GTGAAGGACGTATTCGACAGCCCTGTCTTTGCCGATCTGGCAGTCATCAT
CCCTCAAGGACTTGCTATGCAGAACCCTGTTGCTGAAGGACAGGACAAGC
AAGCTGGTCCTCGAGAGTTGCCCTCGTACAGAAGTCGAGAAGATGCTG
TGCAGGAGTTCGCAGCTGGTCTTGGTGTCCCGTTGGTATCACTGACAA
CTTCTTCGATCICGGTGGTCACTCGCTCATGGCTACTAAGCTAGCTGTGC
GAATTGGCCGTCGCCCTTGAIACCGCCATCACAGTCAAGGACATCTTCGAC
TACCCTGTGCTTTTCCAATTGGCGAAGAAGTTGGAGTCTTCGCATTCCAA
GACCTACGAGGAGTCTGGCGACGATATCCAGATGGCCGATTACACTGCAT
TCCAGCTCCTCGATCTGGAAGACCCCAAGACTTTGTTCACTCCAGATT
CGCCCTCAACTGGACTCCTGCTACGGCACCATCCAGGATGTCTACCCGTC
TAGCGAGATGCAAAGGCCTTCTCTTCGATCCCACGACCGGCGAGCCCC
GAGGTCTTGTGCCCTTCTATATCGACTTCCCCAGCAATGCAGATGCCGAG
ACCCTCACCAAGGCTATCGGAGCTCTAGTTGACAAGCTCGATATGTTAG
AACTGTCTTCTGGAGCCGCGAGGCGATCTGTACCAAGTTGTCGTTGAGC
ACCTCAACTTGCCTATTGAGACCATCGAGACTGAGAAGAAGCTCAACACT
GCAACCGGTGACTACCTGGATGTTTCATGGAAGGACCCTGTCCGTC TAGG
CCACCCGTGCATCCAATTCGCCATCCTGAAGACTGCCTCCTCTGTACGTG
TTCTCCTGCGAATGTCCCACGCTCTGTATGATGGTTTGAGTTTIGAGTAC
ATCGTCCGTTGCTCCACGTTCTCTACAGCGGTAGAAACCTCCCCCACC
AACACAGTTTGGCGGATACATGCAGTATGCTGCACACAGTCGTGAAGAAG
GTTATCCCTTCTGGCGGAGGTTCTGCAGAACGCGCCCATGACAGTTCTA
CACGACACCAATAACGGTATGTCTGAGCAAGAGATGCCAGCCTCCAAGGC
GGIACACCTGTCAGAGGTGTCACGTTCCAGCGCAAGCTATTGAAACA
GTACCAACACCCCAAGCGACCGTCTTCAACACCGCCTGTGCCCTTGTCTA
GCCAAGGAATCCGGCTCACAGGATGTGCTCTCGGCCGTAATTGCTCTGG
TCGACAAGGTCTACCAGTCGTCTGGCAGGACATCATCGGCCCTGCACAA
ACGCCGTGCCCGTCCACGCACGCTCGACGATGGAACCCCAACGCATC
ATCCGCGACCTACGCGACCAATACCTCCGCACCTCGCCCTTCGAATCGCT
TGGCTTCGAGGAAATCAAGCGTAACTGCACGGACTGGCCCGAAGAATTGA
CCAACCTTCTCTGTCTGCGTGACGTACCACAACCTTCGAGTACCACCCGAG
AGCGAAGTTGACAAACAAAAGGTTGAGATGGGAGTTTGGCAAAGTATGT

ES 2 682 743 T3

TGAGTTGAGTGAAAACGAGCCGCTGTACGATCTTGCTATTGCGGGAGAGG
TTGAGGCGGATGGAGTTAACCTGAAGGTCCTGTTGTTGCAAAGGCAAGG
CTTTACAATGAGGCGAGGATTAGACATGTGCTTGAGGAAGTTTGCAAAC
TTTCAATGGTTTGAACGAGGCTTTGTAG

Seq ID No. 2

Sintetasa química PF/Beauvericin

>PF/Beauv

ATGTCAAACATGGCACCACCTCCCTACGATGGGCGTTGAGCAGCAAGCCCT
 ATCACTTTCATGCCCTTACTCCCTCATGACGATGAGAAACACTCAGACA
 ACCTTTACGAGCAAGCAACTCGGCACTTCGGCTTGAGCCGAGACAAGATC
 GAAAATGTCTTACCATGTACTTCCCTTCAATGTGATGTATAGATTGCGC
 CGTCGACGATCGGCGCATGCTATCGGTACGTCGCTCTATGATATCCCA
 ATACAGTGGACATCCAGCGTTTAGCCGCAGCCTGGAAAGAGGTTGTGCGG
 CAGACACCAATCTTGAGGACCGGCATCTTACATCAGAAACCGCGACTC
 TTTTCAGATCGTCTTGAAAGAAGGCTGCCTACCGTGGATGTACGCGACAT
 GTCTCGGCATGAAGGGGCGAGTATACAAGATGAAGCAGTCGCCCTATG
 ACTGGACCGCGTTGCAATCGATATGTCGTCTGGAGACCCGAGTACGAA
 GCAAAGGCTGCTCATCTGGACATTCAGCCATGCTTTAGTGGATTATACAG
 TCCAGGAACGCATCCTTCAGCGGTTCTCACAGTATACGACGGCCGGGAC
 GTCGAGTGCCCTCGCATCAAGGATACAGAACATGCTCTCGGTTTTGGCA
 ACAACACTTTGAAGGCTTAGATGCCTCCGTATTTCCCTTCTACCATCTC
 ACCTAACTGTGTGCAATCCCAATGCGCGCGCAGAACATCATATCTCATA
 ACGGGACCACTCCAGAGGAACTGCTCCCATACAAGTATCTGTCCGGCTGC
 ACTCGCAGTCTCTTATCTCGCTTTACACACTCTTCGGAGGCCCTCTTCG
 GTGTTGTGACAGAACAATCTCACAACTCCGAGGACCAAAGACGGTCAATT
 GATGGCCCCGCAAGGACAGTAGTGCCTATCCGCGTCTTTGTGCCCCAGA
 TCAATATGTGTCGGATGTCAATGGGGCAATCACCGCACACGAACACGCCA
 TCGCGGGTTTGAGCACGCTGGACTTCGCAATATCCGCCGTACCGGAGAC
 GACGGGTCTGCTGCTTGTGGATTCCAGACCGTGTACTGGTGACTGACGG
 TGATGCTCCCAAGACCCCTGGGAGTGTACTTCATCGAAGTGTAGAAGAAT
 CGGATAGATTGATGCCCTGCGCTAAATCGTGCCCTTCTGCTCGACTGCCAG
 ATGGCTGGCAACTCGGCATCCCTAGTCGCACGATATGATCATAATGTGAT
 CGACCCACGCCAGATGTCTCGCTTCTGCGACAGCTAGGATACCTGATCC
 AACAAATTCATCATCAGTICGATCTGCCTCTGGTCAAAGAAGTGGACGTC
 GTGACGGCGGAGGATTGTGCGGAAATCGAGAAATGGAATTCAGAACGCCCT
 AACAAATGCAAGACGCCCTTAATCCACGACACCATATCCAAGTGGGCTGCTG
 CGCATCCCAACAAAGCTGCAGTTTTTCGCTTGGGATGGGGAATGGACATA
 GCCGAGCTAGACAACATATCTCCCGTCTCGCCGIGTATATCCAATCCCT
 GGACTTGAGACCAGGACAAGCAATACTCCCACTCTGCTTCGAGAAGTCAA
 AATGGGTCGTGCGCCACAATCTCGCCGTCTCAAAGCCGGTCCGGGCATTC
 AACTCATCGACCCGTGCGACCCCTCGGCAAGGATGGCCAGGTCTGTCA

ES 2 682 743 T3

GCAGACCTCCGCCACAGTCGCTCTCACCTCCAACTCCACAACACCACCT
TACGTTCCGTCGTTTCCCCTGTCATTGTTGGTCGACGACGACCTCCTTCGG
TCCTTACCCCGCGCCGATGGCCGCTTAAAGGCCACCGTGAAGCCACAGGA
CTTGGCCTATGTTATTTTCACATCTGGCAGCACAGGAGAGCCGAAAGGCA
TCATGATCGAACATCGGGGGTTCGTGTCGTGTGCTATGAAATTTGGCCCC
GCGCTCGGAATGGATGAGCACACGCGCGCTCTTCAATTCGCCTCATATGC
GTTTGGCGCTTGTCTGGTAGAAGTTGTGACAGCTCTGATGCACGGCGGCT
GCGTCTGCATCCCTTCCGATGACGATCGCTTGAACAATGTACCGGAGTTC
ATCAAAAGGGCCAGGTGAACTGGGTGATACTCACTCCGTCGATATATCGG
GACATTCAGCCGGAAGATGTCCTTGGACTACAAACACTGGTATTGGTTG
GAGAACCTATCTCAGCGTCTATTCGGGATACCTGGGCCCTCCAGGTTGGA
CTCCTGAATGCCTACGGTCAGAGTGAAAGCTCAACTATGTGCAGCGTCAC
GGAAGTCAGCCCGCTCTCCCTCGAACCGAACAATATCGGTGGGCTGTAG
GCCACGATCCIGGATCATTGATCCCGACGAGCCTGATCGTCTTGCTCCA
AATGGCTGCATTGGAGAGCTAGTGAICGAAAGTCGGGCAATTGCGCGGA
CTATATCATCGCGCCGCGCCGACAAAGTCCCCCTTTCTCCTAGCACCCC
CGCCCTGGTATCCAGCCGGGAAATTATCCAACGCCTTTAAATTTTACAAG
ACTGGAGATCTCGTGCGTTATGGACCTGACGGCACCATCGTCTGCGCTGGG
ACCCAAAGATTCGCAAGTGAAGATCCGAGGGCAGCGCGTAGAGATCAGCG
CAGTGGAAAGCCAGTCTACGACGACAACCTACCTAGTGACATCAIGCCCGTG
GCCGAAGCTATCAAACGCTCGGATTCTGTCAGGCAGCACAGTCTTGACTGC
CTTCTTGATAGGGTCATCTAAGAGTTTATCTGCGGCAGACGCCGTTATCT
TGGATCACGGTGTACCAACGAGATAAACGCGAAGTTGCAGCAAATCCTT
CCCCAGCATTCCGTTCCATCCTATTATATCCACATGGAAAATCTTCCTCG
AACTGCCACCGCAAAGCGGACAGGAAAATGCTTCGATCTATIGCTAGCA
AGCTATTGGGTGAATTGTCTCAGAACGTGACATCTCAACCGATTGAGAAG
CACGATGCCCCAGCAACTGGTATAGAGGTCAAGCTGAAGGAGCTTTGGTT
TCTGAGCTTGAATCTTAATCCCAACTCTCAAGATGTCGGAGCGAGTTTCT
TTGACTTAGGGGAAATTCATTATCGCCATCAAATGGTAAACATGGCG
AGTTCAGCTGGGATAGCACTGAAGGTATCCGACATATCCAGAAATCCCAC
GCTTGCCTGCTTCAGGCCGIGATGAGCGGCGATTCTACGCCCTCGACCA
TCACGACGCCCTTGGCCACCATCCGCGCTCGACTTGGGACGGACCCGTT
GAGCAGTCTTACTCTCAAGGTCGATTGTGGTTCTCTGACCAGCTGGATAT
TGGAGCTGATGGTACCTGATACCTTAIGCCGTTGCGATGCGGGGAGCTC
TCAACATTGACGCTCTACGTGCTGCTCTGCTGGCGTTGGAGCAGCGACAC
GAGACCCTGCGGACGACCTTTGAGAACCAAAACGGTGTAGGAGTGCAGAT
TGTTACCAAAGACTTGCCAAGGAGCTGAAAATATCGATGCGTTCGTCC
ACGGCGATGACGGCTACCTCCAGCCACTTGAGCAGGAGCAGACCACTCCA

ES 2 682 743 T3

TTCGATCTGACTTGTGAGGCGGGCTGGAGGGCAICTACTCATCTGCGTCSG
CGAGGACCATCATGTCTTGTCTATTGTTCATGCAICACATTGTCTCCGATG
GCTGGTCCATTGACGTGCTGCGGCAAGAACTAGGCCAGCTCTACGCAGCG
GTTTTGCATGGCGACGAGGATCCTCTGTGCGCCGTGAGCCCGCTCCCAT
ACAGTATCGAGACTTTTCCAIGTGGCAGAGACGTCAACAGGTGCGCCGAGC
ATCACAGACAGCTTCAATACIGGCGGAAACAGCTCGCAGACTGCTCGCCG
GCCAAGCTGCCCACCGATTTCCCCGACCACCCTTGCTGTCCGGCGACGC
TGGCAGCGTACCGGTGGAGATTTCGGGCGAGCTGTTCCAAAAGCTGCACA
GGTTCTGCAACGTGACCAGCACGACCCCGTTTGCCGTGCTTCTGGCCGCG
TTTCGTGCTGCGCATTACCGACTCACCAGGGTTCGACGACGCGCTCGTGGG
CACGCCATTGCCAACCGGAACCGGCCGAGCTGGAGCGCTGATTGGTT
TCTTTGTCAACACGCAATGTATGCGCATCACCGTGGACGATGATGATACA
TTIGAGGGCTTGGTACGCCAAGTCCGTAGGACAACGACTGAGGCCTTTGA
AAACGAAGATGTCCTTTGAAACGCGTCGTGTCGCCATGCTACCGGCAG
GAGGAGGATCCAGAGATTIGTCCAGACGCCCTGGCACAGCTCATCTTT
GCCGTGCACTCGCAAGAAAATCTAGGCAAGTTTGAGCTAGAAGGTCTCGA
GTCGGAACCTGTTGCGAACAAGGCATATACGCGCTTTGACGCTGAATTC
ACCTGTTCCAAACTCGTGACGGATTAACGGCTACTTGAACCTTTGCCGCG
GAATTGTTCAAGCTAGAGACGATGCAAAATGTCCTCAGCGTCTTCTTACA
GATTCTACGCCATGGACTGGAGCAGCCTAAATCCTTGATATCCGTTTTGC
CGCTTACTGACGGGTTAAAGGAGCTCGACAGCATGGGCCCTTGAAGATT
CAICGGGGGCTTGAATATCAGCGAGACTCTAGCCTAGTCGACATCTICCG
CAGCCAGGTTGCTACTTGTCTGATACAATTGCCGTGCTGACTCATCAG
CACGTCTGACGTATGCTCAGCTGGACCATCAGTCCAACCTACTCGAGGCC
TGGATTGCGCCGAAAGGCTTCCCGGCCGAATCAITGGTTGGCGTGTCTTC
ACCGCGGTCCIGCGAGACAATCATCGCCTTTCTTGGTATTCTCAAAGCAA
ACCTGGCATACTGCCGCTTGATCCAAAATCCCCTGTCTCTCGTATGAGG
GACGTCTGTCCGATTTACCAGGTCACACAATCATCCTGCTTGGCTCCGA
CGTGGCCGCCCCGACCTTGAAGTACCTTGTGTTGGAGCTCGTACGCATTT
CTEACGCCTTGAAATCTGGTGCAGCGCAGTCAATGGCAGTGAGACGACA
GACTTGTGCGCTCCGTCGGCGAACAGTCTTGCAIACGTTTTGTACACGTC
AGCGTCGACTGGGCGACCAAGGGAGTCAATGGTTGAGCACCGTGTCTATTG
TACGGCTTGTGACGCGCGCTGATACCAAATTTCCCCGTTGCGAGGA
GCAATCATGGCACATCTCTTCAATACCGTCTTTGACGGCGCGACCTATGA
AATTTTCTCATGCTTTTGAACGGCGGCACGTTGGTCTGCATTGACTATC
TGACCACATTGAGCCCCAAGCACTCGAAACCGTCTTCTGAGAGAAGGA
ATCAACTGTGCAATCATGACACAGCGCTGCTTAAGCTGTATCTAGCCAA
TGCCCGCGATGGCTTAAAGGCACTCGACATGCTCATGGTCTGCTGGAGACC

ES 2 682 743 T3

GGITCGATCCGCAGGACGCAGTCGAGGCACAGACTCTGGTCCGCGGTGAC
TGCTACAACGCCTACGGCCCCGACCAGAAATGGAGTCATGAGTACTCTGTA
CAAAATTGATACAAGTGACTCCTTCATCAACGCGCTCCCTCTAGGTCGCG
CTATAGACAACCTCTGGAGCCTACATTACCGACCCAAATCAGCAGCTTGTC
GGCCCCGGCGTTTTGGGAGAGCTCATCGTCACCGGAGACGGGCTCGCTCG
GGGTACACGGACCAGCACTCGACAGAGACCGAATCGTACAAGTCGTCA
TCAACGGCGAGTCTGTGAGCATAATCGGACCGGAGACCGCATGCGCTAC
CGCGCAGGCCAAGATTGTCTTTTCGAATTCCTTGGACGCATGGACTTTCA
ATTCAAGATTGGAAGCAACCGCATCGAGTCGGCCGAGGTGGAAGCTGCCA
TTCTCAGTCATCCTCTGGTTCGCGATGCAGCCATTGTTGTTGTTGGTGTG
CAAGAGGAACAAGAGCCAGAAATGGTTGGGTTCTGTGTTGCTGCTGACGA
TGCCGTTGAGCAAGAGGCCACAGACAACCAAGTCGAGGGTTGGCAAGAAC
TGITTGAGAGTAGCATGTACAACGGCATCGATGCAATAAGCCCGTCTGCT
CTCGGCAAGGACTTTACAGGGTGGACGTCATGTACGATGGAAGTGAAAT
CGACAAGTCGGAGATGCAGGAGTGGCTCGACGATACGATACATACTCTAC
GGCAGGTCATGTACCGGGCATGTCTGGAGATTGGAACCGGTACAGGT
ATGATCTTGTFTAACCTCGGCTCTGTTGAGAGCTACGTAGGTCTGGAACC
CACCAAGTCCGCGGTCGAGTTTGTCAACAAGGCCATCAAGACCCTGCCAA
AICTCGCAGGAAGGGCCGAGGTTCACTGGCACCGCCACAGATACTCGAC
CAGCTGAGCGGACTGCGGCCAGACCTTGTATACTAAACTCTGTGGTTCA
GTACTTTCCACAGTAGAATATCTGACACGGGTTGTGGACGCTCTGCTCC
GGATACGCGCGCTCAAACGTCCTCTCTTTGGTGAIGTGCATCACAGGCG
CTACACAGACAGTTTCTTGTCTGCTGTGCGATGCACGCAC TAGGCAAGAC
GGCAGCCAGGGACGACGTCGCGAGATACATGGCAGAGCGGGAGGAGCGGG
AGGAGGAGCTGCTCGTCGAGCCAGCCTTTTTACAGCACTCATGAACCGG
CAICCCAATCTGATCCAGCAGTCGAGATTCTGCCAAGAATATAAGGGC
CACAAATGAGCTGAGCGCATACCGTTATGCAGCCGTCGTCATCTACGTG
ATCCGGAGTCTGCGGCGCGGCGGTGTATCCGATTGCGGCAGACGACTGG
GTCGACTTTTCAGGCCTCCAGATGCGCAGCGACGTCCTTCGAGAATACCT
GCGTCTCTCGGCCGGTGCCGATACCGTGGCTGTCIGCAATATTCGGTACG
AAAAGACCATCTTTGAGAGACTGATTGTGAGTCACTTGATGACAACACC
GGCAGTGACGCGCCACAGAGTAGGCTGCATGGCAGGTCACTAGATGGCGC
GCCCTGGATATCCGCCGTCGCTCCGACGCGAGAGCCGGGCATCCCTCT
CCGTGCCGGACCTTGTGACGCTAGCCGCCGAGTCTGGCTTCCAGGTACAG
GTGAGTGCCGCACGACAGTGGTCGAGAGCGGCGGCTGGACGCGCTTT
CCACCGCCGCCACGCTCGTCTCTCAGCCGACTATGCGCACACTCTTCC
AAITCCCCGACGACAATGCACTGCGAGCTTCGGCTACCCGTGACGAACCGG
CCGCTGCAGCGGCTGCAGAGACGTCGCGTCGCGGCGCAGATTGCGGAACG

ES 2 682 743 T3

GCTGCAGACGCTGGTGCCGTCGTACATGATTCTGCGCAAGATTGTGGTGC
TGGACCAGATGCCTCTCAACGCCAATGGCAAGGTCGACCGGAAGGAGCTG
GCICGTAGAGCCCGGACGACGACGATGACGAAGAAAAAGAAGCCGACGCG
ATTGGCGTCGGAGCCAGCTTGTCCAATCAGCGACATTGAGGTTGCACTGT
GCGAGGAGGCCACGGCAACGTTTGAATGCAAGTCGGCATCAGCGATCAC
TTTTTCAAACTCGGCGGTCAATTCTCTGCTTGTACAAAACATATCCCG
CGTCGGCGACAGACTGAAAGCGCGCCTGACGGTCAAGGATGTCTTTGATC
ACCCAAATCTTTTCCGAGCTTGCATTGTCATACGCGAGGGGCTGCAAAA
GTCGTGCCCGTGGCTTTGAATGGTGGTGGACAAGCGAAGCAAGGGTCGGC
GGCAGTAGTAGCGCCGCAATGAAATGGAACGATGCTGTGTGAGGAGT
TTGCCAATGTCCTTGGCATGGATGTCGGAGTCACGGACAACTTTTTIGAC
CTCGGTGGGCATTCGCTCATGGCGACAAGCTGGCAGCGCGGATTGGGCG
TCGATTGAATACTACGATATCAGTGAAGGAGGTCCTTGAACACCCGATTG
TGITTCAGCTCGCCAATTCCTTAGAGCTGGGTCAGTTGGAGAGCGACAGA
GTAAAGCACACAATGTTGGCCGATTACACTGCGTTTCAACTCTTGTCTGT
TGAAGATTTGCAAGGCTTTCITCAAACGAGATAAGCCCTCAACTTGAAT
GTGCACATGGCGGTATTCAGAATGATATCCAGCCACGCATATGCAAAA
GCGTTTTTATGCGACGCGTCAACCGGACATCCCAAGCCTCTTGTGCCGT
CTACATGACTTTCCTCCGACTCAGACTGTTCTACTCTGGTCGAGGCGT
GCTCATCTCTGGTGAAGCGTTTCGACATGTTTCAGGACAGTGGTCGTGAA
GCIGCAGGCGAACTGTATCAAGTCGTTTTAGAGCACTTTGATCTACAGAT
TGATGTCGTGAGACGGAGGAAAACGTCACGCGCGGACGAACGATTTG
TGCACAGAATCTTGGAGGTGCCCGTCCATCTCGGGCAACCCTGATACAA
TTCACCATTTCTCAAGCAGGCGTCTTCAGTACGAGTCTTGCTTTGTCTTTC
TCACGCCCTCTATGATGGCTTGAGTTTGGAGCACGTCGTGCGGATCTGC
ACATGCTTTACAAAGCCGGTCCCTGCTGCCAGCGAATCAGTTCTCACGG
TACATGCAATACATGGACCACACGCGCAAAGCCGGCTGTGACTTTTGGCG
CGATGTCATACAAGATACGCCAATCACTGTCTCGGCCATGTCGATGCTG
GTGGCCGTGAGCTAGAAGTGAAGCAGCGCGGACATTGCACGCGACAAA
ATTIATTAGATTCTCTGCAGGCTGTCCGCAGCAGCATATTACGCAGSC
GACAGTCTTCAAAGCIGCCIGTGCICIGTGCIGTCTCGAGAAAACGGCG
CCAAGGACGTCGTCTTTGGCCGATCGTGTGCGGCGGCAAGCCCTGCCG
GTGAGCTGGCAAAAACATTGTGGGCGGTGCACCAATGCCGTACCGGTGCG
CGCCCGATCATCGACGACGACGACGACAACCACCGGCAGATGCTCCGCG
ACATGCAAGACCAGTACCTCCTGAGCCTGCCGTTTGGAGACGCTCGATTT
GACGAGGTCCGACGACGCTGCACAAACTGGCCGCGACGGCCAAACACTA
CGCGTGTGCGTGACGTACCACGACTTTTCATACCACCCAGAGAGCGAGA
TGGAGCAGCAGCGGTCGAGATGGGCGTGTGGCCAGAAAGGATGCGCTG

ES 2 682 743 T3

CTCAAGGAGGAGCCCGTGTACGACCTGGGCATCGCAGGAGAGGTTGAGCC
GGATGGCGTGCACTTGCAAGTTACCGTGGTCGCAAAGACGAGGCTGTTTA
GTGAAGAGAGGGCCGCATACCTGATGGAAGAGGTGTGTAGACTGTTTGAG
AGTCTAAACTCGGCTTTGTGA