



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 358**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/52** (2006.01)      **C12N 9/00** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)      **C12N 9/10** (2006.01)  
**C07K 14/21** (2006.01)      **C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)      **C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01)      **C12P 17/12** (2006.01)  
**C07D 471/22** (2006.01)      **C07D 471/18** (2006.01)  
**A61K 31/4995** (2006.01)      **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03782652 .6**

96 Fecha de presentación : **19.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1576159**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Agrupación de genes implicados en la biosíntesis de safracina y sus usos para ingeniería genética.**

30 Prioridad: **20.12.2002 GB 0229793**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.11.2009**

73 Titular/es: **PHARMA MAR, S.A.**  
**c/ de la Calera, 3**  
**Polígono Industrial de Tres Cantos**  
**28760 Tres Cantos, Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Velasco Iglesias, Ana;**  
**Calle, Fernando de la;**  
**Aparicio Pérez, Tomás;**  
**Schleissner Sánchez, Carmen;**  
**Acebo Pais, Paloma;**  
**Rodríguez Ramos, Pilar;**  
**Reyes Benítez, Fernando y**  
**Henríquez Peláez, Rubén**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Agrupación de genes implicados en la biosíntesis de safracina y sus usos para ingeniería genética.

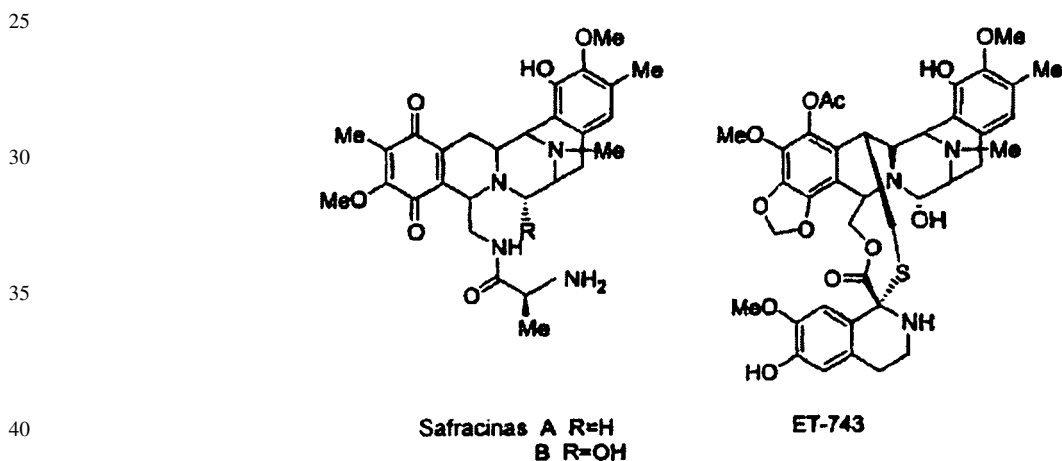
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la agrupación de genes responsable de la biosíntesis de safracina, a sus usos para ingeniería genética y a nuevas safracinas obtenidas mediante manipulación del mecanismo de biosíntesis.

10 **Antecedentes de la invención**

Las safracinas, una familia de nuevos compuestos con una potente actividad antibacteriana de amplio espectro, se descubrieron en un caldo de cultivo de *Pseudomonas sp.* La safracina se produce en dos cepas de *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens* A2-2 aislada de una muestra de suelo recogida en Tagawagun, Fukuoka, Japón (Ikeda *et al.* J. Antibiotics 1983, 36,1279-1283; documentos WO 82 00146 y JP58113192) y *Pseudomonas fluorescens* SC 12695 aislada de muestras de agua tomadas del Raritan-Delaware Canal, cerca de Nueva Jersey (Meyes *et al.* J. Antibioti. 1983, 36(2), 190-193). Las safracinas A y B, producidas por *Pseudomonas fluorescens* A202, se han examinado frente a diferentes líneas de células tumorales y se ha encontrado que tienen actividad antitumoral además de actividad antibacteriana.

El documento EP0055299 (Koshitomi Pharmaceutical Industries Ltd) da a conocer la producción de safracinas mediante la cepa *Pseudomonas* A2-2.



Debido a las similitudes estructurales entre safracina B y ET-743, la safracina ofrece la posibilidad de la hemisíntesis del nuevo potente agente antitumoral sumamente prometedor ET-743, aislado del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* y que está actualmente en ensayos clínicos de fase II en Europa y los Estados Unidos. Se ha logrado una hemisíntesis de ET-743 partiendo de safracina B (Cuevas *et al.* Organic Lett. 2000, 10, 2545-2548; documentos WO 00 69862 y WO 01 87895).

Como una alternativa de preparación de safracinas o sus análogos estructurales mediante síntesis química, la manipulación de genes de metabolismo secundario gobernante ofrece una alternativa prometedor y permite la preparación de estos compuestos de manera biosintética. Adicionalmente, la estructura de safracina ofrece posibilidades fascinantes para la biosíntesis combinatoria.

En vista de la estructura compleja de las safracinas y las limitaciones en su obtención a partir de *Pseudomonas fluorescens* A2-2, sería sumamente deseable entender la base genética de su síntesis con el fin de crear los medios para influir sobre ellas de una manera dirigida. Esto podría aumentar las cantidades de safracinas que van a producirse, debido a que las cepas de producción natural generalmente proporcionan sólo bajas concentraciones de los metabolitos secundarios que son de interés. También podría permitir la producción de safracinas en huéspedes que de otra manera no producen estos compuestos. Adicionalmente, podría usarse la manipulación genética para la creación combinatoria de análogos de safracina novedosos que podrían mostrar propiedades mejoradas y que podrían usarse en la hemisíntesis de nuevos compuestos de ecteinascidinas.

Sin embargo, el éxito de un enfoque biosintético depende de manera crítica de la disponibilidad de sistemas genéticos novedosos y de genes que codifican actividades enzimáticas novedosas. La dilucidación de la agrupación de genes de safracina contribuye al campo general de la biosíntesis combinatoria expandiendo el repertorio de genes únicamente asociados con la biosíntesis de safracina, conduciendo a la posibilidad de preparar precursores novedosos y safracinas por medio de biosíntesis combinatoria.

**Compendio de la invención**

Ahora se puede identificar y clonar los genes de la biosíntesis de safracina, que proporcionan la base genética para mejorar y manipular de un manera dirigida la productividad de *Pseudomonas sp.*, y usar métodos genéticos, para sintetizar análogos de safracina. Adicionalmente, estos genes codifican enzimas que participan en procesos biosintéticos para producir estructuras, tales como precursores de safracina, que pueden formar la base de la química combinatoria para producir una amplia variedad de compuestos. Estos compuestos pueden examinarse para determinar una variedad de bioactividades incluyendo actividad anticancerosa.

Por tanto en un primer aspecto la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado, que comprende una SEQ ID NO: 1, una variante o parte de la misma que codifica al menos un polipéptido que cataliza al menos una etapa de la biosíntesis de safracinas o b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia en a). En el presente documento se describe una agrupación de genes, de manera adecuada una agrupación de genes aislada, con marcos de lectura abiertos que codifican polipéptidos para dirigir el ensamblaje de una molécula de safracina.

Un aspecto de la presente invención es una composición que incluye al menos una secuencia de ácido nucleico, de manera adecuada una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica al menos un polipéptido que cataliza al menos una etapa de la biosíntesis de safracinas tal como se describe en el presente documento. Dos o más secuencias de ácido nucleico de este tipo pueden estar presentes en la composición. También se proporcionan ADN o ARN correspondiente.

En particular la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende la SEQ ID NO: 1, una parte o unas partes de dicha secuencia de ácido nucleico en el que dicha parte o dichas partes codifica(n) para un polipéptido o unos polipéptidos o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido o unos polipéptidos, una secuencia de ácido nucleico monocatenaria derivada de dicha secuencia de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico monocatenaria derivada de una parte o unas partes de dicha secuencia de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico bicatenaria derivada de la secuencia de ácido nucleico monocatenaria (tal como ADNc de ARNm). La secuencia de ácido nucleico puede ser de ADN o ARN.

Más particularmente, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada, que incluye o comprende al menos la SEQ ID 1, variantes o partes de la misma, o al menos uno de los genes *sacA*, *sacB*, *sacC*, *sacD*, *sacE*, *sacF*, *sacG*, *sacH*, *sacI*, *sacJ*, *orf1*, *orf2*, *orf3* u *orf4*, incluyendo variantes o partes. Las partes pueden tener al menos 10, 15, 20, 25, 50, 100, 1000, 2500, 5000, 10000, 20000, 25000 o más nucleótidos de longitud. Normalmente las partes están en el intervalo de 100 a 5000, o de 100 a 2500 nucleótidos de longitud, y son funcionales biológicamente.

Mutantes o variantes incluyen moléculas de polinucleótido en las que al menos un residuo de nucleótido está alterado, sustituido, deleciónado o insertado. Múltiples cambios son posibles, con un nucleótido diferente en 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 500 o más posiciones. Se prevé variantes degeneradas que codifiquen el mismo polipéptido, así como variantes no degeneradas que codifiquen un polipéptido diferente. La parte, el mutante o la variante de secuencia de ácido nucleico codifica de manera adecuada un polipéptido que conserva una actividad biológica del polipéptido respectivo codificado por cualquiera de los marcos de lectura abiertos de la agrupación de genes de safracina. Se abarcan las formas alélicas y los polimorfismos.

También se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico aislada que puede hibridarse en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico de esta invención. Se prefiere particularmente la hibridación con una longitud traducible de una secuencia de ácido nucleico de esta invención.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un polipéptido que es idéntico en al menos el 30%, preferiblemente el 50%, preferiblemente el 60%, más preferiblemente el 70%, en particular el 80%, el 90%, el 95% o más en secuencia de aminoácidos a un polipéptido codificado por cualquiera de los marcos de lectura abiertos de agrupación de genes de safracina de *sacA* a *sacJ* y de *orf1* a *orf4* (SEQ ID 1 y genes codificados en la SEQ ID 1) o codificado por una variante o parte de la misma. El polipéptido conserva de manera adecuada una actividad biológica del polipéptido respectivo codificado por cualquiera de los marcos de lectura abiertos de agrupación de genes de safracina.

También se describe una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica cualquiera de las proteínas SacA, SacB, SacC, SacD, SacE, SacF, SacG, SacH, SacI, SacJ, Orf1, Orf2, Orf3 u Orf4 (SEQ ID 2-15), y variantes, mutantes o partes de la misma.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento que comprende al menos uno de los genes *sacA*, *sacB*, *sacC*, *sacD*, *sacE*, *sacF*, *sacG*, *sacH*, *sacI*, *sacJ*, que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-11, incluyendo variantes o partes de la misma, en la que las variantes o partes codifican un polipéptido que conserva la actividad biológica del polipéptido respectivo.

En un aspecto, una secuencia de ácido nucleico aislada de esta invención codifica una péptido sintetasa, un derivado de L-Tyr hidroxilasa, un derivado de L-Tyr metilasa, una L-Tyr O-metilasa, una metil-transferasa o una monooxigenasa o una proteína de resistencia a safracina.

## ES 2 329 358 T3

La invención también proporciona una sonda de hibridación que puede hibridarse en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico tal como se definió anteriormente. Las sondas comprenden de manera adecuada una secuencia de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 o más residuos de nucleótido. Se prefieren secuencias con una longitud en el intervalo de 25 a 60. La invención también se refiere al uso de una sonda tal como se define para la detección de un gen de safracina o ecteinascidina. En particular, la sonda se usa para la detección de genes en *Ecteinascidia turbinata*.

En un aspecto relacionado la invención se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico tal como se definió anteriormente. Se prevén polipéptidos de secuencia completa, variantes, mutantes o fragmentos.

En un aspecto adicional la invención se refiere a un vector, preferiblemente un vector de expresión, preferiblemente un cósmido, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o un fragmento biológicamente activo de una proteína, en el que dicho ácido nucleico es tal como se definió anteriormente.

En otro aspecto la invención se refiere a una célula huésped transformada con una o más de la secuencias de ácido nucleico tal como se definió anteriormente, o un vector, un vector de expresión o cósmido tal como se definió anteriormente. Una célula huésped preferida se transforma con un ácido nucleico exógeno que comprende una agrupación de genes que codifican polipéptidos suficiente para dirigir el ensamblaje de una safracina o análogo de safracina. Preferiblemente la célula huésped es un microorganismo, más preferiblemente una bacteria.

La invención también se refiere a una célula huésped bacteriana recombinante en la que al menos una parte de una secuencia de ácido nucleico tal como se definió anteriormente está interrumpida para dar como resultado una célula huésped recombinante que produce niveles alterados de compuesto de safracina o análogo de safracina, con respecto a una célula huésped bacteriana no recombinante correspondiente.

La invención también se refiere a un método de producción de un compuesto de safracina o análogo de safracina que comprende fermentar, en condiciones y en un medio adecuados para producir un compuesto o análogo de este tipo, un organismo tal como *Pseudomonas sp.*, en el que se ha aumentado el número de copias de los genes/la agrupación de safracina que codifican polipéptidos suficientes para dirigir el ensamblaje de una safracina o análogo de safracina.

La invención también se refiere a un método de producción de un compuesto o análogo de safracina que comprende fermentar, en condiciones y en un medio adecuados para producir tal compuesto o análogo, un organismo tal como *Pseudomonas sp.* en el que la expresión de los genes que codifican polipéptidos suficientes para dirigir el ensamblaje de una safracina o análogo de safracina se ha modulado mediante manipulación o sustitución de uno o más genes o secuencia responsable de regular tal expresión. Preferiblemente se potencia la expresión de los genes.

La invención también se refiere al uso de una composición que incluye al menos una secuencia de ácido nucleico aislada tal como se definió anteriormente o una modificación de la misma para la biosíntesis combinatoria de péptidos no ribosómicos, anillos de dicetopiperazina y safracinas.

En particular el método implica poner en contacto un compuesto que es un sustrato para un polipéptido codificado por uno o más de los marcos de lectura abiertos de la agrupación de genes de la biosíntesis de safracina tal como se definió anteriormente con el polipéptido codificado por uno o más marcos de lectura abiertos de la agrupación de genes de la biosíntesis de safracina, mediante lo cual el polipéptido modifica químicamente el compuesto.

Todavía en otra realización, esta invención proporciona un método de producción de una safracina o análogo de safracina. El método implica proporcionar un microorganismo transformado con un ácido nucleico exógeno que comprende una agrupación de genes de safracina que codifica polipéptidos suficiente para dirigir el ensamblaje de dicha safracina o dicho análogo de safracina tal como se describió anteriormente; cultivar las bacterias en condiciones que permiten la biosíntesis de safracina o análogo de safracina; y aislar dicha safracina o dicho análogo de safracina de dicha célula.

También se describen los compuestos precursores P2 y P14, análogos y derivados de los mismos y su uso en la biosíntesis combinatoria de péptidos no ribosómicos, anillos de dicetopiperazina y safracinas.

También se describen nuevas safracinas obtenidas mediante safracina P19B, safracina P22A, safracina P22B, safracina D y safracina E desactivadas, y su uso como agentes antimicrobianos o antitumorales, así como su uso en la síntesis de compuestos de ecteinascidina.

También se describen nuevas safracinas obtenidas mediante biosíntesis dirigida tal como se definió anteriormente, y su uso como agentes antimicrobianos o antitumorales, así como su uso en la síntesis de compuestos de ecteinascidina. En particular se describen safracina B-etoxilo y safracina A-etoxilo y su uso.

También se describe la preparación de estructuras relacionadas con las safracinas y ecteinascidinas que no pueden prepararse o son difíciles de preparar mediante síntesis química. Otro aspecto descrito en el presente documento es usar el conocimiento para obtener acceso a la biosíntesis de ecteinascidinas en *Ecteinascidia turbinata*, por ejemplo usando estas secuencias o partes como sondas en este organismo o supuesto simbiote.

Más fundamentalmente, la invención abre un amplio campo y da acceso a ecteinascidinas mediante ingeniería genética.

### Breve descripción de las figuras

5

Figura 1: Organización estructural de la región de ADN cromosómico clonado en cósmido pL30p. Se muestra la región del ADN de *P. fluorescens* A2-2, que contiene la agrupación de genes de safracina. Se ilustran los operones de gen tanto *sacABCDEFGH* como *sacIJ*, y la organización modular de las péptido sintetetas deducidas de *sacA*, *sacB* y *sacC*. Se indican los siguientes dominios: C: condensación; T: tiolación; A: adenilación y Re: reductasa. Se muestra la ubicación de otros genes presentes en el cósmido pL30p (de *orf1* a *orf4*) así como su función propuesta.

Figura 2: Motivos de núcleo conservados entre NRPS. Secuencias de aminoácidos conservadas en las proteínas SacA, SacB y SacC y su comparación con sus secuencias homólogas de *Myxococcus xanthus* DM50415.

Figura 3. Mecanismo de biosíntesis de NRPS propuesto por la formación del dipéptido Ala-Gly. Etapa a\*, adenilación de Ala; b\*, transferencia a la rama de 4'-fosfopanteteinilo; c\*, transferencia al sitio de espera/elongación; d\*, adenilación de la Gly; e\*, transferencia a la rama de 4'-fosfopanteteinilo; f\*, condensación de la cadena de elongación en la rama de 4'-fosfopanteteinilo con la cadena de partida en el sitio de espera/elongación; g\*, dipéptido Ala-Gly unido a la rama de fosfopanteteinilo de SacA y h\*, transferencia de la cadena alargada al siguiente sitio de espera/elongación.

Figura 4: Experimentos de alimentación cruzada. A. Esquema de fragmentos de ADN de A2-2 clonados en el vector pBBR1-MCS2 y productos obtenidos en el huésped heterólogo. B. Perfil de HPLC de producción de safracina en cepa de tipo natural frente a mutante *sacF*. La adición de precursor P2 al mutante *sacF*, proporcionado tanto *in trans* como sintéticamente, proporciona la producción safracina B. SfcA, safracina A y SfcB, safracina B.

Figura 5: Esquema del mecanismo de biosíntesis de la safracina y compuestos intermedios biosintéticos. Las etapas enzimáticas individuales se indican mediante una flecha continua y las etapas de reacciones múltiples se indican mediante flechas discontinuas.

30

Figura 6: Interrupciones del gen de la safracina y compuestos producidos. A. Interrupción de gen y moléculas precursoras sintetizadas por los mutantes construidos. El gen marcado con un asterisco no pertenece a la agrupación de safracina. Se ha demostrado que la desactivación de los genes *orf1*, *orf2*, *orf3* y *orf4* no tiene efecto sobre la producción de safracina. B. Perfil de HPLC de producción de safracina en cepa de tipo natural y en mutantes *sacA*, *sacI* y *sacJ*. Se muestra la estructura de las diferentes moléculas obtenidas.

35

Figura 7: Estructura de las diferentes moléculas obtenidas mediante interrupción de gen. La desactivación de la proteína SacJ (a) proporciona las moléculas P22B, P22A y P19, mientras que la interrupción de gen de *sacI* (b), produce solamente el compuesto P19. La interrupción de *sacI*, junto con la expresión reconstruida de *sacJ*, produce dos nuevas safracinas: safracina D (posible precursor para la hemisíntesis de ET-729) y safracina E (c).

40

Figura 8: Adición de precursores "no naturales" diseñados específicos (P3). Estructura química de las dos moléculas obtenidas por la adición de compuesto P3 al mutante *sacF*.

Figura 9: Esquema del evento de interrupción de gen a través de recombinación simple, usando un fragmento de ADN homólogo clonado en pK18:MOB (un plásmido integrativo en *Pseudomonas*).

### Descripción detallada de la invención

Las péptido sintetetas no ribosómicas (NRPS) son enzimas responsables de la biosíntesis de una familia de compuestos que incluyen un gran número de productos naturales diversos estructural y funcionalmente. Por ejemplo, péptidos con actividades biológicas proporcionan el esqueleto estructural para compuestos que muestran una variedad de actividades biológicas tales como agentes antibióticos, antivirales, antitumorales e inmunosupresores (Zuber *et al.* Biotechnology of Antibiotics 1997 (W. Strohl, ed.), 187-216 Marcel dekker, Inc., N.Y; Marahiel *et al.* Chem. Rev. 1997, 97, 2651-2673).

55

Aunque son estructuralmente diversos, la mayoría de estos péptidos biológicamente activos comparten un esquema de biosíntesis mecánico común. Según este modelo, la formación de enlaces peptídicos tiene lugar en multienzimas denominadas péptido sintetetas, en las que se activan sustratos de aminoácidos mediante hidrólisis de ATP para dar el correspondiente adenilato. Este producto intermedio inestable se transfiere posteriormente a otro sitio de las multienzimas en el que se une como un tioéster al grupo cisteamina de un cofactor 4'-fosfopanteteninilo (4'-PP) unido a enzima. En esta fase, los sustratos activados por tiol pueden experimentar modificaciones tales como epimerización o N-metilación. Entonces se integran los aminoácidos con sustrato tioesterificado en el producto peptídico mediante un elongación por etapas mediante una serie de reacciones de transpeptidación. Con esta disposición en molde en las péptido sintetetas, los módulos parecen funcionar independientemente unos de otros, pero actúan conjuntamente para catalizar la formación de enlaces peptídicos sucesivos (Stachelhaus *et al.* Science 1995, 269, 69-72; Stachelhaus *et al.* Chem. Biol. 1996, 3, 913-921). El esquema general para la biosíntesis no ribosómica de péptidos se ha revisado

65

## ES 2 329 358 T3

ampliamente (Marahiel *et al.* Chem. Rev. 1997, 97, 2651-2673; Konz y Marahiel, Chem. and Biol. 1999, 6, R39- R48; Moffit y Neilan, FEMS Microbiol. Letters 2000, 191, 159-167).

Recientemente se ha clonado, secuenciado y caracterizado parcialmente un gran número de operones bacterianos y genes fúngicos que codifican péptido sintetasa, proporcionando un valioso conocimiento de su arquitectura molecular (Marahiel, Chem y Biol. 1997, 4, 561-567). Se usaron diferentes estrategias de clonación, incluyendo la exploración dentro de todas las bibliotecas de expresión mediante anticuerpos preparados frente a péptido sintetasa, complementación de mutantes deficientes y el uso de oligonucleótidos diseñados derivados de secuencias de aminoácidos de fragmentos de péptido sintetasa.

El análisis de la estructura primaria de estos genes reveló la presencia de dominios homólogos diferenciados de aproximadamente 600 aminoácidos. Los dominios funcionales específicos consisten en al menos seis secuencias de núcleo sumamente conservadas de aproximadamente tres a ocho aminoácidos de longitud, cuyo orden y ubicación dentro de todos los dominios conocidos son muy similares (Küsard y Marahiel, Peptide Research 1994, 7, 238-241). El uso de oligonucleótidos degenerados derivados de los núcleos conservados abre la posibilidad de identificar y clonar péptido sintetasa a partir de ADN genómico, usando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Küsard y Marahiel, Peptide Research 1994, 7, 238-241; Borchert *et al.* FEMS Microbiol Letters 1992, 92, 175-180).

La estructura de safracina sugiere que este compuesto se sintetiza mediante un mecanismo de NRPS. La clonación y la expresión de las péptido sintetasa no ribosómicas y las enzimas de conformación asociadas a partir de la agrupación de safracina de *Pseudomonas fluorescens* A2-2 permitirá la producción de cantidades ilimitadas de safracina. Además, los genes clonados podrán usarse para la creación combinatoria de análogos novedosos de safracina que podrán mostrar propiedades mejoradas y que podrán usarse en la hemisíntesis de nuevas ecteinascidinas. Además, la clonación y la expresión de la agrupación de genes de safracina en sistemas heterólogos o la combinación de la agrupación de genes de safracina con otros genes de NRPS podrá dar como resultado la creación de fármacos novedosos con actividades mejoradas.

La presente invención proporciona, en particular, la secuencia de ADN que codifica NRPS responsable de la biosíntesis de safracina, es decir, safracina sintetasa. Se ha caracterizado una región de 26.705 pb (SEQ ID NO: 1) a partir del genoma de *Pseudomonas fluorescens* A2-2, se ha clonado en cósmido pL30P y se ha demostrado, mediante experimentos de desactivación y expresión heteróloga, que esta región es responsable de la biosíntesis de safracina. Se ha expresado el cósmido pL30P en dos cepas de *Pseudomonas sp.*, que no producen safracina, y el resultado fue una producción de safracina A y B a niveles de un 22%, para *P. fluorescens* (CECT 378), y un 2%, para *P. aeruginosa* (CECT 110), en comparación con la producción de *P. fluorescens* A2-2. Las secuencias de aminoácidos previstas de los diversos péptidos codificados por esta secuencia de ADN se muestran en SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 15 respectivamente.

La agrupación de genes para la biosíntesis de safracina derivada de *P. fluorescens* A2-2 se caracteriza por la presencia de varios marcos de lectura abiertos (ORF) que se organizan en dos operones divergentes (figura 1), un operón de ocho genes (*sacABCDEFGH*) y un operón de dos genes (*sacIJ*), precedidos por supuestas regiones de promotores bien conservadas que se solapan. La agrupación de genes para la biosíntesis de safracina sólo está presente en una copia en el genoma de *P. fluorescens* A2-2.

Los resultados indican que el operón de ocho genes será responsable de la biosíntesis del esqueleto de la safracina y el operón de dos genes será responsable de la conformación final de las safracinas.

En el operón *sacABCDEFGH*, las secuencias de aminoácidos deducidas codificadas por *sacA*, *sacB* y *sacC* se asemejan mucho a productos génicos de NRPS. Dentro de las secuencias de aminoácidos deducidas de *SacA*, *SacB* y *SacC*, se identificó un módulo de péptido sintetasa en cada uno de los ORF.

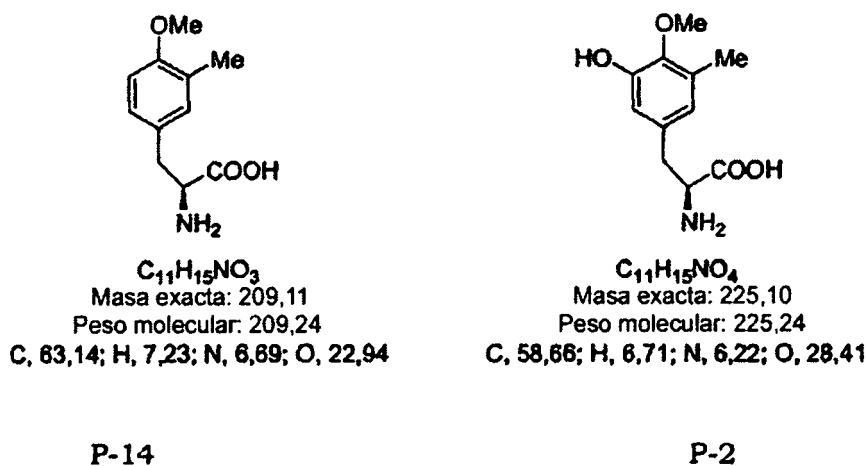
La primera característica sorprendente de las proteínas de safracina NRPS es que a partir de los sitios activos y las regiones de núcleo conocidos de las péptido sintetasa (Konz y Marahiel, Chem. and Biol. 1999, 6, R39-R48), el primer núcleo está poco conservado en las tres péptido sintetasa, *SacA*, *SacB* y *SacC* (figura 2). Las otras cinco regiones de núcleo están bien conservadas en los tres genes de safracina NRPS. Se desconoce el significado biológico del primer núcleo (LKAGA), pero las secuencias de núcleo SGT(ST)TGxPKG (Gocht y Marahiel, J. Bacteriol. 1994, 176, 2654-2666; Konz y Marahiel, Chem. and Biol. 1999, 6, R39-R48), TGD (Gocht y Marahiel, J. Bacteriol. 1994, 176, 2654-2662; Konz y Marahiel, 1999) y KIRGxRIEL (Pavela-Vrancic *et al.* J. Biol. Chem 1994, 269, 14962-14966; Konz y Marahiel, Chem. and Biol. 1999, 6, R39-R48) pueden asignarse a unión e hidrólisis de ATP. Puede mostrarse que el residuo de serina de la secuencia de núcleo LGGxS es el sitio de la formación de tioéster (D'Souza *et al.*, J. Bacteriol. 1993, 175, 3502-3510; Vollenbroich *et al.*, FEBS Lett. 1993, 325(3), 220-4; Konz y Marahiel, Chem. and Biol. 1999, 6, R39-R48) y unión de 4'-fosfopanteteína (Stein *et al.* FEBS Lett. 1994, 340, 39-44; Konz y Marahiel, Chem. and Biol. 1999, 6, R39-R48). Estos hallazgos, junto con el hecho de que la safracina parece sintetizarse a partir de aminoácidos, apoya la hipótesis de que la formación no ribosómica de enlaces peptídicos mediante el mecanismo de tiomolde participa en la ruta biosintética de safracina y que *sacA*, *sacB* y *sacC* codifican las péptido sintetasa correspondientes. Según este mecanismo, se activan aminoácidos tales como aminoaciladenilatos mediante hidrólisis de ATP y posteriormente se unen covalentemente a la enzima mediante enlaces carboxilo-tioéster. Entonces, en etapas adicionales, se produce la transpeptidación y la formación de enlaces peptídicos.

En segundo lugar, es sorprendente que los datos de secuencia muestran claramente que la regla de colinealidad, según la cual el orden de los módulos de unión de aminoácido a lo largo del cromosoma va en paralelo con el orden de los aminoácidos en el péptido, no se mantiene para el sistema de safracina sintetasa. Según las homologías de la base de datos de secuencia y las homologías de estructuras de safracina y saframincina, SacA sería responsable del reconocimiento y la activación del residuo Gly y SacB y SacC serían responsables del reconocimiento y la activación de los dos derivados de L-Tyr que se incorporan en el esqueleto de safracina, mientras que faltaría el supuesto gen de Ala-NRPS en la agrupación de genes de safracina. En algunas agrupaciones de genes de péptido sintetetasas no ribosómicas, tales como en las rutas de biosíntesis de pristamicina (Crecy-Lagard *et al.*, J. of Bacteriol. 1997, 179(3), 705-713) y del tripéptido de fosfinotricina (Schwartz *et al.* Appl Environ Microbiol 1996, 62, 570-577), el primer gen de NRPS no está yuxtapuesto con el segundo gen de NRPS. En concreto, en la ruta biosintética de pristamicina el primer gen estructural (*snbA*) y el segundo gen estructural (*snbC*) están separados por 130 kb. Este no es el caso para la agrupación de genes de safracina en la que los resultados de la expresión heteróloga con el cósmido pL30P demuestran claramente que no falta ningún gen de NRPS ya que hay producción de safracina heteróloga.

En tercer lugar, aunque la pregunta sobre el mecanismo mediante el cual se forma el dipéptido Ala-Gly permanece en el aire, la presencia en *sacA* de un dominio C suplementario en el extremo amino-terminal del primer gen de NRPS sugiere la posibilidad de una actividad de activación de adenilación bifuncional por este gen. Se propone que Ala se cargaría en primer lugar en la rama de fosfopanteteinilo de SacA (figura 3 a\* y b\*) antes de transferirse a una posición de espera, un dominio de condensación, situado en el extremo N-terminal de *sacA* (figura 3, c\*). Entonces el adenilato de Gly se cargaría en la misma rama de fosfopanteteinilo (figura 3, d\* y e\*), colocado en el sitio de elongación, y se produciría el elongación (figura 3, f\*). En esta fase la rama del primer módulo estaría cargada con un dipéptido Ala-Gly dipéptido (figura 3, g\*). Se propone que entonces el dipéptido se transferiría a una posición de espera en la segunda rama de fosfopanteteinilo (figura 3, h\*), situada en SacB, para continuar la síntesis del esqueleto básico de tetrapéptido de safracina. Un mecanismo de biosíntesis alternativo podría ser la incorporación directa de un dipéptido Ala-Gly en SacA. En este caso, el dipéptido podría proceder de la actividad de la familia de ribozimas peptidil transferasas sumamente activas (Sun *et al.*, Chem, y Biol. 2002, 9, 619-626) o de la actividad de proteólisis bacteriana.

Y en cuarto lugar, aunque en la mayoría de las péptido sintetetasas procariotas el resto tioesterasa, que parece ser responsable de la liberación de la cadena peptídica madura de la enzima, está fusionado con el extremo C-terminal del último módulo de unión de aminoácido (Marahiel *et al.* Chem. Rev. 1997, 97, 2651-2673), en el caso de las safracina sintetetasas, falta el dominio TE. Probablemente, en la síntesis de safracina tras la última etapa de elongación, podría liberarse el tetrapéptido mediante una estrategia alternativa para la terminación de la cadena peptídica que también se produce en la síntesis de saframincina (Pospiech *et al.* Microbiol. 1996, 142, 741-746). Esta estrategia de terminación particular se cataliza por un dominio de reductasa en el extremo carboxilo-terminal de la péptido sintetasa SacC que cataliza la escisión reductora del grupo acilo unido al dominio T asociado, liberando un aldehído lineal.

Los experimentos de alimentación cruzada indican que los dos últimos aminoácidos incorporados en la molécula de safracina son dos derivados de L-Tyr denominados P2 (3-hidroxi-5-metil-O-metiltirosina) (figuras 4, 5) en vez de dos L-Tyr tal como se propone que se produce en la síntesis de saframincina. En primer lugar, se ha mostrado que los productos de dos genes (*sacF* y *sacG*), similares a metiltransferasas bacterianas, participan en la O-, C-metilación de L-Tyr para producir P14 (3-metil-O-metiltirosina), precursor de P2. Un posible mecanismo podría considerar que en primer lugar se produce la O-metilación y después se produce la C-metilación del derivado de aminoácido. En segundo lugar, P2, el sustrato para las péptido sintetetasas SacB y SacC, se forma mediante la hidroxilación de P14 mediante SacD (figuras 4, 5).



## ES 2 329 358 T3

Aparte de los genes biosintéticos de safracina, en el operón *sacABCDEFGH* también se encuentran dos genes, *sacE* y *sacH*, que participan en una función desconocida y en el mecanismo de resistencia a la safracina, respectivamente. Se ha demostrado que el gen *sacH* codifica una proteína que cuando se expresa de manera heteróloga, en diferentes cepas de *Pseudomonas*, se produce un gran aumento de la resistencia a la safracina B. SacH es una supuesta proteína transmembrana, que transforma el grupo C<sub>21</sub>-OH de la safracina B en un grupo C<sub>21</sub>-H, para producir safracina A, un compuesto con menos actividad antibiótica y antitumoral. Finalmente, aunque todavía se desconoce la supuesta función de SacE, se han encontrado homólogos de este gen cerca de diversas agrupaciones de genes biosintéticos de metabolitos secundarios en los genomas de algunos microorganismos, lo que sugiere una función conservada de estos genes en la formación o regulación de metabolitos secundarios.

En el operón *sacIJ*, las secuencias de aminoácidos deducidas codificadas por *sacI* y *sacJ* se asemejan mucho a productos génicos de metiltransferasa e hidroxilasa/monooxigenasa, respectivamente. Los datos revelan que SacI es la enzima responsable de la N-metilación presente en la estructura de safracina, y que SacJ es la proteína que realiza una hidroxilación adicional en uno de los derivados de L-Tyr incorporados en el tetrapéptido para producir la estructura de quinona presente en todas las moléculas de safracina. La N-metilación es una de las modificaciones de péptidos sintetizados de manera no ribosómica que contribuye significativamente a su actividad biológica. Excepto por la saframicina (Pospiech *et al.* Microbiol. 1996, 142, 741-746), que se produce por bacterias y se N-metila, todos los péptidos no ribosómicos N-metilados conocidos se producen por hongos o actinomicetos y, en la mayoría de los casos, el responsable de la N-metilación es un dominio que reside en la péptido sintetasa no ribosómica.

TABLA I

*Resumen de genes biosintéticos de, y de resistencia a, safracina identificados en el cósmido pL30P*

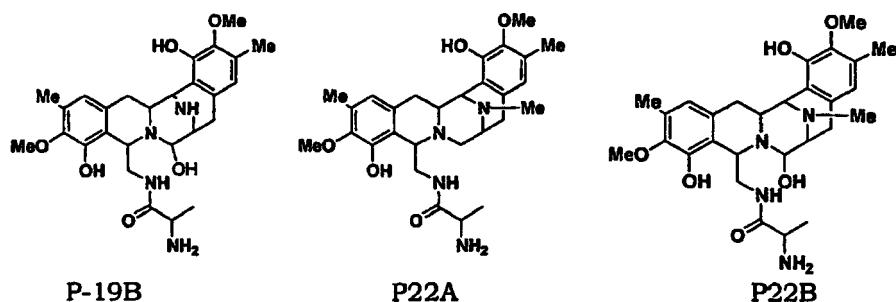
| Nombre de ORF | Nombre de proteína | Función propuesta             | Posición iniciación-terminación pb | Aminoácidos | Peso molecular |
|---------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------|----------------|
| <i>sacA</i>   | SacA               | Péptido sintetasa             | 3052-6063                          | 1004        | 110,4          |
| <i>sacB</i>   | SacB               | Péptido sintetasa             | 6068-9268                          | 1063        | 117,5          |
| <i>sacC</i>   | SacC               | Péptido sintetasa             | 9275-13570                         | 1432        | 157,3          |
| <i>sacD</i>   | SacD               | Derivado de L-Tyr hidroxilasa | 13602-14651                        | 350         | 39,2           |
| <i>sacE</i>   | SacE               | Desconocida                   | 14719-14901                        | 61          | 6,7            |
| <i>sacF</i>   | SacF               | Derivado de L-Tyr metilasa    | 14962-16026                        | 355         | 39,8           |

## ES 2 329 358 T3

|    |             |      |             |             |     |      |
|----|-------------|------|-------------|-------------|-----|------|
|    | <i>sacG</i> | SacG | L-Tyr       | 16115-17155 | 347 | 38,3 |
|    |             |      | O-metilasa  |             |     |      |
| 5  | <i>sacH</i> | SacH | Proteína de | 17244-17783 | 180 | 19,6 |
|    |             |      | resistencia |             |     |      |
| 10 | <i>sacI</i> | SacI | metil-      | 2513-1854   | 220 | 24,2 |
|    |             |      | transferasa |             |     |      |
| 15 | <i>sacJ</i> | SacJ | monooxigena | 1861-355    | 509 | 55,3 |
|    |             |      | sa          |             |     |      |

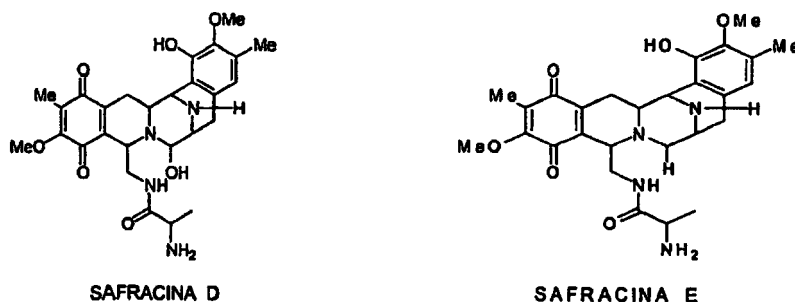
La supuesta ruta sintética de safracina, con indicaciones de los sustratos de aminoácidos específicos usados para cada reacción de condensación y las diversas actividades tras la condensación, se muestra en la figura 5.

Para evaluar adicionalmente el papel de los genes biosintéticos de safracina, se construyeron mutantes desactivados de cada uno de los genes de la agrupación de safracina (figura 6). La interrupción de los genes de NRPS (*sacA*, *sacB* y *sacC*) así como *sacD*, *sacF* y *sacG*, dio como resultado mutantes que no producían safracina y P2. Los resultados indican que los genes de *sacA* a *sacH* son parte del mismo operón genético. Como consecuencia de las interrupciones génicas de *sacI* y *sacJ* se originaron tres nuevas moléculas, P19B, P22A y P22B (figura 6).



La producción de P22A y P22B (figura 7a\*) mediante el mutante de *sacJ* demostró que el papel de la proteína SacJ es producir la hidroxilación adicional del aminoácido de los derivados L-Tyr de la izquierda de la safracina, el que participa en el anillo quinona. La producción de P19B (figura 7b\*) mediante el mutante de *sacI*, una molécula similar a safracina en la que faltan la N-metilación y el anillo quinona, confirma que SacI es la enzima N-metiltransferasa y sugiere que *sacIJ* es un operón transcripcional. La producción de P19B también mediante el mutante de *sacJ* (figura 7a\*) sugiere que probablemente se produce la N-metilación tras haberse formado el anillo quinona. Aunque estas nuevas estructuras no tienen actividad antimicrobiana interesante sobre *B. subtilis* o actividad citotóxica alta sobre células cancerosas, pueden servir como nuevos precursores interesantes para la hemisíntesis de nuevas moléculas activas. En lo que respecta a la actividad de la estructura, la observación de que P19B, P22A y P22B parecen perder su actividad sugiere que la pérdida del anillo quinona de la estructura de safracina está directamente relacionada con la pérdida de actividad de las moléculas de la familia de safracina.

La interrupción del gen *sacI* con la reconstitución de la expresión del gen *sacJ* dio como resultado la producción de dos nuevas safracinas. Los dos antibióticos producidos, a niveles de producción tan altos como los niveles de producción de safracina A/safracina B en la cepa de tipo natural, se denominaron safracina D y safracina E (figura 7c\*).



La safracina D y la safracina E son moléculas similares a safracina B y safracina A, respectivamente, en las que falta la N-metilación. Se ha mostrado que tanto la safracina D como la safracina E tienen las mismas actividades antibacterianas y antitumorales que la safracina B y la safracina A, respectivamente. Aparte de sus altas propiedades de actividades, antibacteriana y antitumoral, la safracina D puede usarse en la hemisíntesis de la ecteinascidina ET-729, un potente agente antitumoral, así como en la hemisíntesis de nuevas ecteinascidinas.

Surge una duda referente al papel de la proteína similar a aminopeptidasa codificada por un gen situado en el sitio 3' del operón de safracina. La desactivación por inserción de *orf1* (PM-S1-14) no mostró efecto sobre la producción de safracina A/safracina B. Debido a sus propiedades de funcionalidad, sigue sin estar claro si esta proteína podría desempeñar algún papel en el metabolismo de la safracina. Los otros genes presentes en el cósmido pL3OP (de *orf2* a *orf4*) tendrán que estudiarse con mayor detalle.

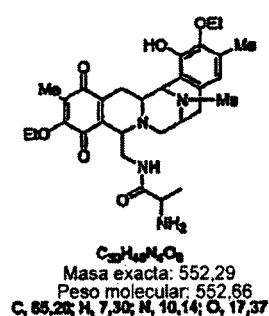
Otro aspecto de la invención es que proporciona las herramientas necesarias para la producción de nuevas moléculas "no naturales" diseñadas específicas. La adición de un precursor de derivado P2 modificado específico denominado P3, un 3-hidroxi-5-metil-O-etiltirosina, al mutante de *sacF* produce dos safracinas "no naturales" que incorporó este precursor modificado específico, safracina A(OEt) y safracina B(OEt) (figura 8).

20

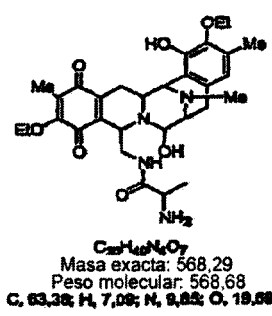
25

30

35



**safracina A(OEt)**



**safracina B(OEt)**

40

Las dos nuevas safracinas son potentes compuestos antibióticos y antitumorales. Las actividades biológicas de safracina A(OEt) y safracina B(OEt) son tan potentes como las actividades de safracina A y safracina B, respectivamente. Estas nuevas safracinas pueden ser la fuente de nuevos agentes antitumorales potentes, así como una fuente de moléculas para la hemisíntesis de nuevas ecteinascidinas.

Además, los genes que participan en la síntesis de safracina pueden combinarse con otros genes de péptido sintetizadas no ribosómicas para dar como resultado la creación de fármacos "no naturales" novedosos y análogos con actividades mejoradas.

50

## Ejemplos

### Ejemplo 1

55

Extracción de moléculas de ácido nucleico a partir de *Pseudomonas fluorescens* A2-2

#### Cepas bacterianas

60

Se hicieron crecer cepas de *Pseudomonas sp.* a 27°C en caldo Luria-Bertani (LB) (Ausubel *et al.* 1995, J. Wiley and Sons, Nueva York, N.Y). Se hicieron crecer cepas de *E. coli* a 37°C en medio LB. Se usaron antibióticos a las siguientes concentraciones: ampicilina (50 µg/ml), tetraciclina (20 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml).

65

# ES 2 329 358 T3

TABLA II

*Cepas usadas en esta invención*

| Código    | Genotipo  |
|-----------|---|
| PM-S1-001 | <i>P. fluorescens</i> A2-2 de tipo natural                              |
| PM-S1-002 | <i>sacA</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-003 | <i>sacB</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-004 | <i>sacC</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-005 | <i>sacJ</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-006 | <i>sacI</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-007 | <i>sacI</i> <sup>-</sup> con reconstitución de expresión de <i>sacJ</i> |
| PM-S1-008 | <i>sacF</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-009 | <i>sacG</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-010 | <i>sacD</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-014 | <i>orf1</i> <sup>-</sup>  |
| PM-S1-015 | A2-2 + pLAFR3   |
| PM-S1-016 | A2-2 + pL30p  |
| PM-19-001 | <i>P. fluorescens</i> CECT378 + pLAFR3                                  |
| PM-19-002 | <i>P. fluorescens</i> CECT378 + pL30p                                   |
| PM-19-003 | <i>P. fluorescens</i> CECT378 + pBBR1-MCS2                              |
| PM-19-004 | <i>P. fluorescens</i> CECT378 + pB5H83                                  |
| PM-19-005 | <i>P. fluorescens</i> CECT378 + pB7983                                  |
| PM-19-006 | <i>P. fluorescens</i> CECT378 + pBHPT3                                  |
| PM-16-001 | <i>P. aeruginosa</i> CECT110 + pLAFR3                                   |
| PM-16-002 | <i>P. aeruginosa</i> CECT110 + pL30p                                    |
| PM-17-003 | <i>P. putida</i> ATCC 12633+ pBBR1-MCS2                                 |
| PM-17-004 | <i>P. putida</i> ATCC 12633+ pB5H83                                     |
| PM-17-005 | <i>P. putida</i> ATCC 12633+ pB7983                                     |
| PM-18-003 | <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588+ pBBR1-MCS2                               |
| PM-18-004 | <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588+ pB5H83                                   |
| PM-18-005 | <i>P. stutzeri</i> ATCC 17588+ pB7983                                   |

*Manipulación del ADN*

A menos que se indique lo contrario, se usaron técnicas convencionales de biología molecular para clonación y manipulaciones de ADN *in vitro* (Sambrook *et al.* 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

*Extracción de ADN*

Se preparó ADN total a partir de cultivos de *Pseudomonas fluorescens* A2-2 tal como se notifica (Sambrook *et al.* 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

*Análisis informáticos*

Se compilaron datos de secuencia y se analizaron usando un paquete de software DNA-Star.

Ejemplo 2

*Identificación de genes de NRPS responsables de la producción de safracina en Pseudomonas fluorescens A2-2*

*Diseño de cebadores*

Marahiel *et al.* (Marahiel *et al.* Chem. Rev. 1997, 97, 2651-2673) notificaron previamente motivos de núcleo sumamente conservados de los dominios catalíticos de péptido cíclico y ramificado sintetasas. Basándose en múltiples alineaciones de secuencias de diversas péptido sintetasas notificadas se seleccionaron como diana los módulos de regiones conservadas A2, A3, A5, A6, A7 y A8 de adenilación y T de tiolación para el diseño del cebador degenerado (Turgay y Marahiel, Peptide Res. 1994, 7, 238-241). Las posiciones de tubo se diseñaron con respecto a las preferencias de codón dentro de los módulos seleccionados y el contenido en G/C que se esperaba alto de *Pseudomonas sp.* Todos los oligonucleótidos se obtuvieron de ISOGEN (Bioscience BV). Se obtuvo un fragmento de PCR cuando se usaron oligonucleótidos degenerados derivados de las secuencias YGPT (núcleo de A5) y LGGXS (núcleo de T). Estos oligonucleótidos se denominaron PS34-YG y PS6-FF, respectivamente.

TABLA III

*Cebadores de PCR diseñados para este estudio*

| <b>Denominación del cebador y orientación</b> | <b>Secuencia</b>            | <b>Longitud</b> |
|---|-----------------------------|-----------------|
| PS34-YG (directo)                             | 5' -TAYGGNCCNACNGA-3'       | 14 meros        |
| PS6-FF (inverso)                              | 5' -TSNCCNCCNADNTCRAARAA-3' | 20 meros        |

*Condiciones de PCR para la amplificación de ADN a partir de P. fluorescens A2-2*

Se amplificó un fragmento interno de las péptido sintetasas no ribosómicas (NRPS) usando oligonucleótidos PS-34-YG y PS6-FF y ADN cromosómico de *P. fluorescens* A2-2 como molde. Se usaron tampón de reacción y Taq polimerasa de Promega. El perfil de ciclación realizado en un termociclador personal (Eppendorf) consistió en: 30 ciclos de 1 min. a 95°C, 1 min. a 50°C, 2 min. a 72°C. Los productos de PCR tenían el tamaño esperado (750 pb aprox.) basándose en la ubicación de los cebadores dentro de los dominios de NRPS de otros genes de sintetasas.

*Clonación de ADN*

Se clonaron fragmentos de amplificación de PCR en vector pGEM-Teasy según el fabricante (Qiagen, Inc., Valencia, CA). De esta manera, los fragmentos clonados se flanquean por dos sitios de restricción de EcoRI, con el fin de facilitar la posterior subclonación en otros plásmidos (véase a continuación). Dado que las enzimas NRPS son modulares, los clones a partir de los cebadores de PCR degenerados representan una combinación de fragmentos de diferentes dominios.

## ES 2 329 358 T3

### Secuenciación de ADN

Se realizó toda la secuenciación usando cebadores dirigidos contra el vector de clonación, con un secuenciador automático ABI (Perkin-Elmer). Se identificaron secuencias de ADN clonadas usando el servidor BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica al que se accede a través de Internet (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25, 3389-3521). Todas las secuencias tienen regiones distintivas para NRPS y muestran una alta similitud en búsquedas en BLAST con NRPS bacterianas lo que muestra que de hecho tienen origen peptídico. Además, se realizó una búsqueda de similitud de dominio probable usando el servidor web PROSITE (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania).

### Interrupción génica de *Pseudomonas fluorescens* A2-2

Con el fin de analizar la función de los genes clonados, se interrumpieron estos genes mediante recombinación homóloga (figura 9). Para ello, se digirieron plásmidos recombinantes (derivados de pG-PS) que alojaban el fragmento de gen de NRPS con enzima de restricción EcoRI. Se clonaron los fragmentos resultantes pertenecientes al gen que iba a mutarse en el plásmido movilizable pK18mob (Schafer *et al.* Gene 1994, 145, 69-73), un plásmido integrativo en el cromosoma que puede replicarse en *E. coli* pero no en cepas de *Pseudomonas*. Se introdujeron plásmidos recombinantes en primer lugar en la cepa *E. coli* S17- $\lambda$ PIR mediante transformación y después en *P. fluorescens* A2-2 mediante conjugación biparental (Herrero *et al.*, J Bacteriol 1990, 172, 6557-6567). Se sembraron en placas diferentes diluciones de la conjugación sobre medio sólido LB que contenía ampicilina más kanamicina y se incubaron durante la noche a 27°C. Se seleccionaron transconjugados resistentes a kanamicina, que contenían plásmidos integrados dentro de su genoma mediante recombinación homóloga.

### Ensayo biológico (bioprueba) para determinar la producción de safracina

Se incubaron cepas *P. fluorescens* A2-2 y sus derivados en matraces erlenmeyer de 50 ml con deflectores que contenían medio de fermentación con los antibióticos correspondientes. Inicialmente, se usó medio de fermentación SA3 (Ikeda Y. J. Ferment. Technol. 1985, 63, 283-286). Con el fin de aumentar la productividad del proceso de fermentación, se usaron métodos estadísticos-matemáticos tales como el diseño de Plackett-Burman para seleccionar nutrientes y se sometieron a prueba técnicas de optimización de superficie de respuesta (Hendrix C. Chemtech 1980, 10, 488-497) con el fin de determinar el nivel óptimo de cada variable independiente clave. También se realizaron experimentos para mejorar las condiciones de cultivo tales como temperatura de incubación y agitación. Finalmente se seleccionó un medio sumamente productor de safracina B denominado 16B (152 g/l de manitol, 35 g/l de levadura G20-25, 26 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 14 g/l de sulfato de amonio, 0,18 g/l de cloruro férrico, pH 6,5).

Se sometió a ensayo la producción de safracina sometiendo a prueba la capacidad de inhibición de un cultivo sólido de *Bacillus subtilis* por 10  $\mu$ l del sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas sp.* de 3 días incubado a 27°C (Alijah *et al.* Appl Microbial Biotechnol 1991, 34, 749-755). Cultivos de *P. fluorescens* A2-2 producen zonas de inhibición de 10-14 mm de diámetro mientras que los mutantes no productores no inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*. Tres clones aislados tenían afectada la ruta biosintética de safracina. Con el fin de confirmar los resultados, se realizaron análisis de HPLC de la producción de safracina.

### Análisis de HPLC de la producción de safracina

Se analizó el sobrenadante usando una columna de HPLC Symmetry C-18, 300 Å, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm (Waters) con una precolumna (Symmetry C-18, 5  $\mu$ m, 3,9 x 20 mm, Waters). Un gradiente de tampón acetato de amonio (10 mM, 1% de dietanolamina, pH 4,0)-acetonitrilo fue la fase móvil. Se detectó safracina mediante absorción a 268 nm. En la figura 6, se muestra el perfil de HPLC de safracina y de precursores de safracina producidos por la cepa *P. fluorescens* A2-2 y diferentes estructuras similares a safracina producidas por mutantes de *P. fluorescens*.

## Ejemplo 3

### Clonación y análisis de secuencia de agrupación de safracina

#### PCR inversa e hibridación de biblioteca de fagos

La hibridación de tipo Southern en ADN cromosómicos mutantes verificó la correcta interrupción génica y demostró que el fragmento de péptido sintetasa clonado en el plásmido pK18mob era esencial para la producción de safracina. El análisis de los mutantes no productores de safracina obtenidos demostró que todos ellos tenían una interrupción génica en el mismo gen, *sacA*.

La PCR inversa a partir de ADN genómico y la exploración de una biblioteca de fagos de ADN genómico de *P. fluorescens* A2-2 revelaron la presencia de genes adicionales que flanquean al gen *sacA*, que probablemente participan en la biosíntesis de safracina.

El número de registro de GenBank para los datos de secuencia de nucleótidos de la agrupación biosintética de safracina de *P. fluorescens* A2-2 es AY061859.

#### 5 Construcción de la biblioteca de cósmidos y expresión heteróloga

Para determinar si la agrupación de safracina podía conferir capacidad biosintética de safracina a una cepa no productora, se clonó en un vector de cósmido de amplia gama (pLAFR3, Staskawicz B. *et al.* J Bacteriol 1987, 169, 5789-5794) y se conjugó con una colección de cepas de *Pseudomonas sp* diferentes.

10 Para obtener un clon que contenía la agrupación completa, se construyó y se exploró una biblioteca de cósmidos. Para ello, se digirió parcialmente ADN cromosómico con la enzima de restricción PstI, se desfosforilaron los fragmentos y se ligaron en el sitio de PstI del vector de cósmido pLAFR3. Se empaquetaron los cósmidos con extractos de empaquetamiento Gigapack III Gold (Stratagene) según las recomendaciones del fabricante. Se sembraron las células infectadas de la cepa XL1-Blue sobre LB-agar complementado con 50 µg/ml de tetraciclina. Se seleccionaron clones positivos usando hibridación de colonia con un fragmento de ADN marcado con DIG que pertenecía al extremo 3' de la agrupación de safracina. Con el fin de garantizar la clonación de toda la agrupación, se realizó una nueva hibridación de colonia con un fragmento de ADN del extremo 5'. Sólo el cósmido pL30p mostró múltiples hibridaciones con sondas de ADN. Para confirmar la clonación precisa, se llevaron a cabo amplificación por PCR y secuenciación de ADN con oligonucleótidos de ADN que pertenecían a la secuencia de safracina. El tamaño del inserto de pL30P era de 26.705 pb. El ADN del clon pL30p se transformó dentro de *E. coli* S17λPIR y se conjugó la cepa resultante con las cepas heterólogas de *Pseudomonas sp*. Se introdujo el cósmido pL30p en *P. fluorescens* CECT378 y *P. aeruginosa* CECT110 mediante conjugación biparental tal como se describió anteriormente. Una vez identificado un clon que codificaba para toda la agrupación, se determinó si el candidato podía producir safracina. Se evaluó la producción de safracina en las cepas conjugadas mediante análisis de HPLC y ensayo biológico de sobrenadantes de cultivos en caldo tal como se describió anteriormente.

25 La cepa *P. fluorescens* CECT378 que expresaba el cósmido pL30p (PM-19-002) podía producir safracina en cantidades considerables, mientras que la producción de safracina en la cepa *P. aeruginosa* CECT110 que expresaba pL30P (PM-16-002) era 10 veces menor que en CECT378. La producción de safracina en estas cepas era aproximadamente del 22% y el 2% de la producción total en comparación con la cepa productora natural.

#### 35 Genes que participan en la formación de safracina. Análisis de secuencia de los operones *sacABCDEFGH* y *sacIJ*

Análisis informáticos de la secuencia de ADN de pL30P revelaron 14 ORF (figura 1). Un posible sitio de unión a ribosoma precede a cada uno de los codones de iniciación ATG.

40 En el operón *sacABCDEFGH*, pueden leerse tres ORF muy grandes, *sacA*, *sacB* y *sacC* (posiciones de 3052 a 6063, de 6080 a 9268 y de 9275 a 13570 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2 SEQ ID NO: 1, respectivamente) en la misma dirección y codifican las supuestas safracina NRPS: SacA (1004 aminoácidos,  $M_r$  110452), SacB (1063 aminoácidos,  $M_r$  117539) y SacC (1432 aminoácidos,  $M_r$  157331). Los tres genes de NRPS contienen los dominios que se asemejan a dominios de activación de aminoácidos de péptido sintetasa conocidas. Específicamente, los dominios de activación de aminoácidos de estos tres genes de NRPS son muy similares a tres de los cuatro dominios de activación de aminoácidos (Gly, Tyr y Tyr) encontrados en las saframicina NRPS de *Myxococcus xanthus* (Pospiech *et al.* Microbiology 1995, 141, 1793-803; Pospiech *et al.* Microbiol. 1996, 142, 741-746). En particular, SacA (SEQ ID NO: 2) muestra un 33% de identidad con la proteína saframicina Mx1 sintetasa B (SafB) de *M. xanthus* (número de registro de NCBI U24657), mientras SacB (SEQ ID NO: 3) y SacC (SEQ ID NO: 4) comparten, respectivamente, un 39% y un 41% de identidad con la saframicina Mx1 sintetasa A (SafA) de *M. xanthus* (número de registro de NCBI U24657). La figura 2 muestra una comparación entre SacA, SacB y SacC y los diferentes dominios de activación de aminoácidos de saframicina NRPS.

55 En el sentido 3' de *sacC* existen cinco ORF pequeños que se leen en la misma dirección que los genes de NRPS (figura 1). El primero, *sacD* (posición de 13602 a 14651 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2), codifica una supuesta proteína, SacD (350 aminoácidos,  $M_r$  39187; SEQ ID NO: 5), sin similitud en la base de datos GeneBank. El siguiente, *sacE* (posición de 14719 a 14901 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2), codifica una supuesta proteína pequeña denominada SacE (61 aminoácidos,  $M_r$  6729; (SEQ ID NO: 6)), que muestra cierta similitud con proteínas de función desconocida en las bases de datos (ORF1 de *Streptomyces viridochromogenes* (número de registro de NCBI Y17268; 44% de identidad) y MbtH de *Mycobacterium tuberculosis* (número de registro de NCBI Z95208; 36% de identidad). El tercer ORF, *sacF* (posición de 14962 a 16026 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2), codifica una proteína de 355 residuos con un peso molecular calculado de 39.834 (SEQ ID NO: 7). Esta proteína se asemeja lo más estrechamente a hidroxineurosporeno metiltransferasa (CrtF) de *Chloroflexus aurantiacus* (número de registro de NCBI AF288602; 25% de identidad). La secuencia de nucleótidos del cuarto ORF, *sacG* (posición de 16115 a 17155 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2), predijo un producto génico de 347 aminoácidos que tenía una masa molecular de 38,22 kDa (SEQ ID NO: 8). La proteína, denominada SacG, es similar a O-metiltransferasas bacterianas, incluyendo O-dimetilpuromicin-O-metiltransferasa (DmpM) de *Streptomyces anulatus* (número de registro de NCBI P42712; 31% de identidad). Una búsqueda informática también muestra que esta proteína contiene los tres motivos de secuencia encontrados en diversas metiltransferasas dependientes de S-adenosil-

## ES 2 329 358 T3

metionina (Kagan y Clarke, Arch. Biochem. Biophys. 1994, 310, 417-427). El quinto gen, *sacH* (posición de 17244 a 17783 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2), codifica una supuesta proteína SacH (180 aminoácidos, M<sub>r</sub> 19632; (SEQ ID NO: 9)). Una búsqueda informática de similitudes, entre la secuencia de aminoácidos deducida de SacH y secuencias de otras proteínas, reveló identidad con algunas proteínas hipotéticas conservadas de función desconocida, que contiene un motivo transmembrana bien conservado y un sitio de actividad similar a dihidrofolato reductasa (proteína hipotética conservada de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, número de registro de NCBI P3469; 35% de identidad).

En el sentido 5' del operón *sacABCDEFGH*, leyendo en el sentido opuesto, está situado un operón de dos genes, *sacIJ*. El gen *sacI* (posición de 2513 a 1854) codifica una proteína de 220 aminoácidos (M<sub>r</sub> 24219; (SEQ ID NO: 10)) que se asemeja lo más estrechamente a ubiquinona/manequinona metiltransferasa de *Thermotoga maritime* (número de registro de NCBI AE001745; 32% de identidad). El gen *sacJ* (posición de 1861 a 335) codifica una proteína de 509 aminoácidos (SEQ ID NO: 11), con una masa molecular de 55341 Da, similar a monooxigenasas/hidroxilasas bacterianas, incluyendo supuesta monooxigenasa de *Bacillus subtilis* (número de registro de NCBI Y14081; 33% de identidad) y *Streptomyces coelicolor* (número de registro de NCBI AL109972; 29% de identidad).

Los operones *SacABCDEFGH* y *sacIJ* se transcriben de manera divergente y están separados por aproximadamente 450 pb. Ambos operones están flanqueados por fragmentos de transposasa residuales.

### Genes de la agrupación de safracina relacionados

Se ha encontrado (figura 1) un supuesto ORF (*orf1*; posición de 18322 a 19365 de la secuencia de safracina de *P. fluorescens* A2-2) situado en el extremo 3' de la secuencia de safracina. La proteína ORF1 (SEQ ID NO: 12) muestra similitud con aminopeptidasas de la base de datos Gen Bank (familia de peptidasa M20/M25/M40 de *Caulobacter crescentus* CB15; número de registro de NCBI NP422131; 30% de identidad). Usando la estrategia descrita en el ejemplo 2, la interrupción génica de *orf1* no afecta a la producción de safracina en *P. fluorescens* A2-2.

En el extremo 3' de la secuencia de safracina clonada en el cósmido pL30p, se encontraron tres supuestos ORF (*orf2*, *orf3* y *orf4*). Leyendo en la dirección opuesta al operón *sacABCDEFGH*, el gen *orf2* (posición de 22885 a 21169 de SEQ ID NO: 1) codifica una proteína, ORF2 (SEQ ID NO: 13), con similitudes con la proteína sensora HoxX de *Aquifex aeolicus* (número de registro de NCBI NCO00918,1; 35% de identidad), mientras que el gen *orf3* (posición de 23730 a 23041 de SEQ ID NO: 1) codifica la proteína ORF3 (SEQ ID NO: 14) que comparte un 44% de identidad con una proteína relacionada con glicosil transferasa de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* cepa 306 (número de registro de NCBI NP642442).

El tercer gen está situado en el extremo 3' de SEQ ID NO: 1 (posición de 25037 a 26095). Este gen, denominado *orf4* (posición de 2513 a 1854), codifica una proteína, ORF4 (SEQ ID NO: 15), que se asemeja lo más estrechamente a una proteína hipotética de la familia de isocorismatasa YcdL de *Escherichia coli* (número de registro de NCBI P75897; 32% de identidad).

Presumiblemente, estos tres genes no participarían en la ruta biosintética de safracina, sin embargo, una futura interrupción génica de estos genes confirmará esta suposición.

Las diferentes secuencias de ADN encontradas se indican al final de la memoria descriptiva.

### Ejemplo 4

#### Análisis funcional de los locus de safracina y búsqueda de posibles precursores

Dado que en la actualidad se desconoce la ruta para la síntesis de safracina en *P. fluorescens* A2-2, la desactivación de cada uno de los genes descritos en el ejemplo 3 permitirá estudios fundamentales sobre el mecanismo de biosíntesis de safracina en esta cepa.

Con el fin de analizar la funcionalidad de cada proteína particular en la ruta de producción de safracina, se realizó la interrupción de cada gen particular de la agrupación, salvo *sacE*. Todos los mutantes genéticos se obtuvieron siguiendo la estrategia de interrupción descrita anteriormente.

La figura 6 es un resumen de los diferentes mutantes construidos en esta invención así como un resumen de los compuestos producidos por los mutantes como consecuencia de la interrupción génica. En la cepa de tipo natural se detectaron claramente mediante HPLC tanto safracina A como B como otros compuestos, P2 y P14 (véase la figura 6, WT). La interrupción génica de los genes *sacA* (PM-S1-002), *sacB* (PM-S1-003), *sacC* (PM-S1-004), *sacD* (PM-S1-010), *sacF* (PM-S1-008) y *sacG* (PMS1-009) generó mutantes que no podían producir ni safracina A ni safracina B, ni los compuestos precursores con tiempos de retención inferiores a 15 min., P2 y P14 respectivamente. El esclarecimiento de la estructura de P14 y P2 reveló que P14 es una 3-metil-O-metil-tirosina, mientras que P2 es una 3-hidroxi-5-metil-O-metil-tirosina. Debido al pequeño tamaño del gen *sacE*, no pudo obtenerse el mutante *sacE*<sup>-</sup> mediante interrupción génica, pero la delección de este gen está en proceso. La sobreexpresión de la proteína SacE,

## ES 2 329 358 T3

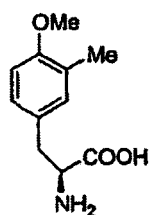
en trans, no tuvo ningún efecto sobre la producción de safracina B/A. Los mutantes *sacF*<sup>-</sup> (PM-S1-006) produjeron P2, P14 y una cantidad significativa de un compuesto denominado P19B (figura 6; figura 7b\*). El esclarecimiento de la estructura de P19B reveló que este compuesto es una molécula similar a safracina en la que faltan el N-Met y uno de los OH del anillo quinona. En los mutantes *sacJ*<sup>-</sup> (PM-S1-005), se obtuvieron P2, P14, P19B y dos nuevos compuestos denominados P22A y P22B (figura 6; figura 7a\*). El esclarecimiento de la estructura de P22A y P22B reveló que son moléculas similares a safracina A y safracina B, respectivamente, sin uno de los grupos -OH del anillo quinona. El ensayo biológico de los extractos de mutantes *sacF*<sup>-</sup> y *sacJ*<sup>-</sup> reveló una actividad muy baja frente a *Bacillus subtilis*.

La interrupción del gen *sacI* con la reconstitución de la expresión del gen *sacJ* dio como resultado un nuevo mutante productor de safracinas, PM-S1-007. Los dos antibióticos producidos, a niveles de producción tan altos como los niveles de safracina A y safracina B en la cepa de tipo natural, se han denominado safracina D y safracina E (figura 7c\*). La safracina D y la safracina E son moléculas similares a safracina B y safracina A, respectivamente, en las que falta la N-metilación.

Estos resultados sugieren fuertemente que i) los genes *sacA*, *sacB* y *sacC* codifican las safracina NRPS; ii) los genes *sacD*, *sacF* y *sacG* son responsables de la transformación de L-Tyr en el derivado de L-Tyr P2 y iii) *sacI* y *sacJ* son responsables de las modificaciones de conformación que convierten P19 y P22 en safracina.

### Caracterización de precursores naturales

#### P-14



$C_{11}H_{15}NO_3$   
Masa exacta: 209,11  
Peso molecular: 209,24  
C, 63,14; H, 7,23; N, 6,69; O, 22,94

#### Cepa

*Pseudomonas fluorescens* A2-2 (tipo natural) (PM-S1-001).

#### Condiciones de fermentación

A un medio de siembra YMP3 que contenía el 1% de glucosa; el 0,25% de extracto de ternera; el 0,5% de bactopectona; el 0,25% de NaCl; el 0,8% de CaCO<sub>3</sub> se le inoculó el 0,1% de una reserva vegetativa congelada del microorganismo, y se incubó en un agitador rotativo (250 rpm) a 27°C. Tras 30 h de incubación, se transfirió el 2% (v/v) del cultivo de siembra a matraces Erlenmeyer de 2000 ml que contenían 250 ml del medio de producción M-16B, compuesto por el 15,2% de manitol; el 3,5% de levadura de cerveza seca; el 1,4% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; el 0,001% de FeCl<sub>3</sub>; el 2,6% de CO<sub>3</sub>Ca. La temperatura de la incubación fue de 27°C desde la inoculación hasta 40 horas y después de 24°C hasta el proceso final (71 horas). No se controló el pH. La agitación del agitador rotativo fue de 220 rpm con 5 cm de excentricidad.

#### Aislamiento

Tras 71 horas de incubación, se combinaron 2 matraces Erlenmeyer y se aclararon los 500 ml de caldo de fermentación mediante centrifugación a 7.500 rpm durante 15 minutos. Se añadieron 50 gramos de la resina XAD-16 (Amberlite) al sobrenadante y se mezcló durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se recuperó la resina del caldo aclarado mediante filtración. Se lavó dos veces la resina con agua destilada y se extrajo con 250 ml de isopropanol (2-PrOH). Se secó el extracto de alcohol a alto vacío hasta la obtención de 500 mg de extracto bruto. Se disolvió este producto bruto en metanol y se purificó mediante columna cromatográfica usando Sephadex LH-20 y metanol como fase móvil. Se eluyó el compuesto P-14 y se secó como 15 mg de sólido amarillento. Se sometió a prueba la pureza mediante HPLC analítica y RMN de <sup>1</sup>H.

## ES 2 329 358 T3

También se aisló P-14 de una manera similar a partir de cultivos del mutante *sacJ*<sup>-</sup> (PM-S1-005), usando HPLC semipreparativa como la última etapa del procedimiento de purificación.

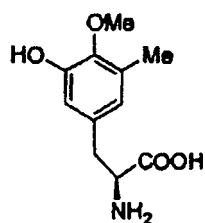
### 5 *Actividades biológicas*

NO ACTIVO.

### 10 *Datos espectroscópicos*

ES-EM m/z 254 (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub><sup>+</sup>), 232 (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>), 210 (M+H<sup>+</sup>). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7,07 (d, J=8,1 Hz, H-9), 7,06 (s, H-5), 6,84 (d, J=8,1 Hz, H-8), 3,79 (s, H-11), 3,72 (dd, J=8,7, 3,9 Hz, H-2), 3,20 (dd, J=14,4, 3,9 Hz, H-3a), 2,91 (dd, J=14,4, 8,9 Hz, H-3b), 2,16 (s, H-10). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 174,1 (C-1), 158,6 (C-7), 132,5 (C-5), 128,9 (C-9), 128,5 (C-4), 128,0 (C-6), 111,4 (C-8), 57,6 (C-2), 55,8 (C-11), 37,4 (C-3), 16,3 (C-10).

## P-2



C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>  
Masa exacta: 225,10  
Peso molecular: 225,24

C, 58,66; H, 6,71; N, 6,22; O, 28,41

### *Cepa*

*Pseudomonas fluorescens* A2-2 (tipo natural) (PM-S1-001).

### *Condiciones de fermentación*

El mismo procedimiento que el de P-14.

### *Aislamiento*

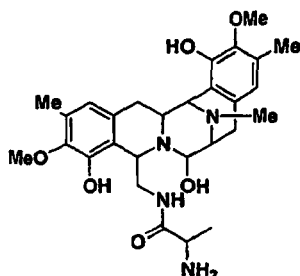
Procedimiento similar al de P-14, excepto en la cromatografía Sephadex, en la que las fracciones que contenían P-2 se eluyeron más tarde. Fue necesaria una etapa de HPLC semipreparativa (columna Symmetry Prep C-18, 7,8 x 150 mm, AcONH<sub>4</sub> 10 mM pH=3/CH<sub>3</sub>CN 95:5 mantenido durante 5 min. y después gradiente desde el 5 hasta el 6,8% de CH<sub>3</sub>CN en 3 min.) para purificar P-2. Además este compuesto se aisló a partir del caldo de fermentación de *Pseudomonas putida* ATCC12633+pB5H83 (PM-17-004) como resultado de la expresión heteróloga.

### *Actividades biológicas*

NO ACTIVO.

### *Datos espectroscópicos*

ES-EM m/z 226 [M+H]<sup>+</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): 6,65 (d, J = 1,8 Hz, H-5), 6,59 (d, J = 1,8 Hz, H-9), 3,72 (s, H-11), 3,71 (dd, J = 9,0, 4,2 Hz, H-2), 3,16 (dd, J = 14,4, 4,2 Hz, H-3a), 2,83 (dd, J = 14,4, 9,0 Hz, H-3b), 2,22 (s, H-10); RMN de <sup>13</sup>C (DMSO, 75 MHz): 170,88 (s, C-1), 150,025 (s, C-7), 144,56 (s, C-8), 132,28 (s, C-4), 130,36 (s, C-6), 121,73 (d, C-5), 115,55 (d, C-9), 59,06 (q, 7-OMe), 55,40 (d, C-2), 36,21 (t, C-3), 15,86 (q, 6-Me).

5 **COMPUESTO P-22B**

20  $C_{28}H_{38}N_4O_6$   
 Masa exacta: 526,28  
 Peso molecular: 526,62  
 C, 63,86; H, 7,27; N, 10,64; O, 18,23

25 *Cepa*

Mutante *sacJ* de *P. fluorescens* A2-2 (PM-S 1-005).

30 *Condiciones de fermentación*

35 Se vertieron 50 litros del medio SAM-7 (50 l) compuesto por dextrosa (3,2%), manitol (9,6%), levadura de cerveza seca (2%), sulfato de amonio (1,4%), fosfato secundario de potasio (0,03%), cloruro de potasio (0,8%), cloruro de hierro (III) 6-hidratado (0,001%), L-tirosina (0,1%), carbonato de calcio (0,8%), polipropilenglicol 2000 (0,05%) y antiespumante ASSAF 1000 (0,2%) en un fermentador en recipiente (Bioengineering LP-351) con una capacidad total de 75 l y, tras la esterilización, se añadieron antibióticos estériles (ampicilina 0,05 g/l y kanamicina 0,05 g/l). Entonces se inoculó cultivo de siembra (2%) de la cepa mutante PM-S1-005. Se llevó a cabo la fermentación durante 71 h. en condiciones aireadas y con agitación (1,0 l/l/min. y 500 rpm). Se controló la temperatura desde 27°C (desde la inoculación hasta 24 horas) hasta 25°C (desde 24 h hasta el proceso final). Se controló el pH a pH 6,0 mediante alimentación automática de ácido sulfúrico diluido desde las 22 horas hasta el proceso final.

45 *Aislamiento*

50 Se aclaró todo el caldo (centrifugadora Sharples). Se ajustó el pH del caldo aclarado hasta pH 9,0 mediante adición de NaOH al 10% y se extrajo con 25 litros de acetato de etilo. Tras 20 min. de mezclado, se separaron las dos fases. Se congeló durante la noche la fase orgánica y después se filtró para eliminar el hielo y se evaporó hasta obtener un extracto verde oscuro grasiento (65,8 g). Se mezcló este extracto con 500 ml de hexano (250 ml en dos veces) y se filtró para eliminar las impurezas solubles en hexano. El sólido restante, tras secarse, dio 27,4 g de un extracto verde-beis oscuro.

55 Se disolvió este nuevo extracto en metanol y se purificó mediante una cromatografía Sephadex LH-20 (usando metanol como disolvente móvil) y se eluyeron los compuestos similares a safracinas en las fracciones centrales (analizado en condiciones de CCF: fase normal de sílice, fase móvil: EtOAc:MeOH 5:3. Valor de R<sub>f</sub> aprox.: 0,3 para P-22B, 0,25 P-22A y 0,1 para P-19).

60 Se purificaron las fracciones combinadas (7,6 g) que contenían los tres compuestos similares a safracina mediante una columna de sílice usando una mezcla de EtOAc:MeOH desde 50:1 hasta 0:1 y otro sistema cromatográfico (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 50:45:5:0,1 isocrático). Se purificaron los compuestos P22-A, P22-B y P19-B mediante HPLC en fase inversa (columna Symmetry Prep C-18 150 x 7,8 mm, 4 ml/min., fase móvil: 5 min. de MeOH:H<sub>2</sub>O (0,02% de TFA) 5:95 y gradiente desde MeOH:H<sub>2</sub>O (0,02% de TFA) 5:95 hasta el 100% de MeOH en 30 min.).

# ES 2 329 358 T3

## Actividades biológicas de safracina P-22B

5

10

15

| Líneas celulares (morb) |       |          |          |       |          |          |          |          |       |          |          |            |          |          |            |          |          |
|-------------------------|-------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|----------|
| Explanación<br>Ortizola | P-22B |          | P-22C    |       | P-22D    |          | P-22E    |          | P-22F |          | P-22G    |            | P-22H    |          |            |          |          |
|                         | OP-16 | OP-17    | OP-17    | OP-17 | OP-17    | OP-17    | OP-17    | OP-17    | OP-17 | OP-17    | OP-17    | OP-17      | OP-17    | OP-17    |            |          |          |
| P-22B                   | 680   | 4.95E-05 | 3.02E-07 |       | 6.48E-07 | 3.02E-05 | 8.24E-07 | 5.28E-07 |       | 4.71E-05 | 1.19E-07 | 4.27E-08   | 1.91E-05 | 2.54E-05 | 6.92E-05   | 7.81E-07 | 1.69E-07 |
| P-22C                   | 763   | 8.62E-05 | 6.06E-07 |       | 2.39E-05 | 7.04E-05 | 2.28E-05 | 9.96E-07 |       | 8.83E-05 | 4.67E-07 | 1.17E-05   | 2.25E-05 | 6.04E-05 | 1.93E-05   | 1.93E-05 | 9.32E-07 |
| P-22D                   | 1.030 | 1.82E-05 | 1.29E-05 |       | 1.21E-05 | 1.65E-05 | 8.19E-05 | 2.01E-05 |       | 1.65E-05 | 1.04E-05 | > 1.99E-05 | 1.65E-05 | 1.04E-05 | > 1.99E-05 | 7.42E-05 | 1.06E-05 |

20

Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido

*Bacillus subtilis* 10 µg/disco (6 mm de diámetro): zona de inhibición de 10 mm.

25

Datos espectroscópicos

HRFABMS m/z 509,275351 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 509,276396 Δ 1,0 mmu); LRFABMS usando m-NBA como matriz m/z (intensidad relativa) 509 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (5), 460 (2,7), 391 (3).

30

RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): 6,70 (s, H-15), 6,52 (s, H-5), 4,72 (s a, H-11), 4,66 (d, J = 2,0 Hz, H-21), 4,62 (dd, J = 8,4, 3,7 Hz, H-1), 3,98 (b d, J = 7,6 Hz, H-13), 3,74 (s, 7-OMe), 3,71 (s, 17-OMe), 3,63 (m, señal solapada, H-25), 3,62 (m, señal solapada, H-3), 3,30 (m, H-22a), 3,29 (m, H-14a), 3,18 (d, J = 18,6 Hz, H-14b), 2,90 (m, H-4a), 2,88 (m, H-22b), 2,76 (s, 12-NMe), 2,30 (s, 16-Me), 2,22 (m, H-4b), 1,16 (d, J = 7,4 Hz, H-26);

35

RMN de <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): 170,75 (s, C-24), 149,24 (s, C-18), 147,54 (s, C-8), 145,95 (s, C-7), 145,82 (s, C17), 133,93 (s, C-16), 132,31 (s, C-9), 131,30 (s, C-6), 128,95 (s, C-20), 121,93 (d, C-15), 121,76 (d, C-5), 121,44 (s, C-10), 112,45 (s, C-19), 92,87 (d, C-21), 60,86 (q, 7-OMe), 60,76 (q, 17-OMe), 59,39 (d, C-11), 57,96 (d, C-13), 55,51 (d, C-1), 54,29 (d, C-3), 50,08 (d, C-25), 45,55 (t, C-22), 40,43 (q, 12-NMe), 32,56 (t, C-4), 25,84 (t, C-14), 17,20 (q, C- 26), 16,00 (q, 16-Me), 15,81 (q, 6-Me).

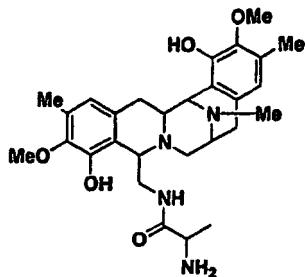
40

### COMPUESTO P-22A

45

50

55



60

Cepa

La misma que para P-22B.

65

Condiciones de fermentación

Las mismas que para P-22B.

*Aislamiento*

El mismo que para P-22B.

5

*Actividades biológicas de safracina P-22A*

*Actividades antitumorales*

10

| Líneas celulares (mo/l)  |      |          |          |            |          |            |          |          |            |          |            |            |            |          |            |          |          |
|--------------------------|------|----------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|------------|------------|------------|----------|------------|----------|----------|
| Estructura tipo primario | C629 | MCF-7    |          | MDA-MB-231 |          | MCF-10     |          | MCF-7    |            | MCF-7    |            | MCF-7      |            | MCF-7    |            | MCF-7    |          |
|                          |      | 1.95E-05 | 1.95E-05 | 1.95E-05   | 1.95E-05 | 1.95E-05   | 1.95E-05 | 1.95E-05 | 1.95E-05   | 1.95E-05 | 1.95E-05   | 1.95E-05   | 1.95E-05   | 1.95E-05 | 1.95E-05   | 1.95E-05 | 1.95E-05 |
| Safracina P22A           | 629  | 1.95E-05 | 1.95E-05 | 7.74E-05   | 1.30E-05 | 1.27E-05   | 5.93E-05 |          | > 1.95E-05 | 1.19E-05 | > 1.95E-05 | 1.26E-05   | > 1.95E-05 | 1.95E-05 | 0.79E-05   | 7.65E-05 |          |
|                          | 721  | 1.95E-05 | 1.26E-05 | 1.95E-05   | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.33E-05 |          | > 1.95E-05 | 7.93E-05 | > 1.95E-05 | 1.95E-05   | > 1.95E-05 | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.95E-05 |          |
|                          | 1320 | 1.95E-05 | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.95E-05 |          | > 1.95E-05 | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | > 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.95E-05 |          |

25

*Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido*

*Bacillus subtilis*, 10 µg/disco (6 mm de diámetro): NO ACTIVO.

30

*Datos espectroscópicos*

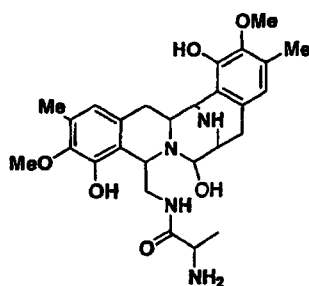
35

HRFABMS m/z 511,290345 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 511,292046 Δ 1,7 mmu); LRFABMS usando m-NBA como matriz m/z (intensidad relativa) 511 [M+H]<sup>+</sup> (61), 409 (25), 391 (4); RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD 500 MHz): 6,68 (s, H-15), 6,44 (s, H- 5), 3,71 (s, 7-OMe), 3,67 (s, 17-OMe), 2,72 (s, 12-NMe), 2,28 (s, 16-Me), 2,20 (s, 6-Me), 0,87 (d, J= 7,1 Hz, H-26);

40

**COMPUESTO P-19B**

45



50

55

*Cepa*

60

La misma que para P-22B.

*Condiciones de fermentación*

65

Las mismas que para P-22B.

# ES 2 329 358 T3

Aislamiento

El mismo que para P-22B.

5

Actividades biológicas de safracina P-19B

Actividades antitumorales

10

| Lineas celulares (nto/lt) |          |            |          |            |            |            |            |            |            |                |            |            |            |            |            |          |
|---------------------------|----------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| Explotación<br>P-19B      | Pizarrón |            | Ovario   |            |            | Mama       |            | Eido-vesc. |            | C. de<br>C. de |            | C. de      |            | C. de      |            |          |
|                           | OD410    | OD490      | OD410    | OD490      | OD410      | OD490      | OD410      | OD490      | OD410      | OD490          | OD410      | OD490      | OD410      | OD490      |            |          |
| safracina P19-B           | 659      | 1.20E-05   | 2.90E-05 | 3.02E-05   | 0.21E-05   | 7.08E-05   | 7.90E-05   |            | > 1.90E-05 | 2.20E-05       | 1.01E-05   | 1.55E-05   | > 1.90E-05 | 1.10E-05   | 6.70E-05   | 4.00E-05 |
| 20002                     | 701      | > 1.90E-05 | 0.00E-05 | 1.00E-05   | > 1.90E-05 | 1.32E-05   | > 1.90E-05 |            | > 1.90E-05 | 5.77E-05       | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | 1.61E-05   | 1.00E-05 |
|                           | 1000     | > 1.90E-05 | 1.57E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 |            | > 1.90E-05 | 1.40E-05       | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | > 1.90E-05 | 1.90E-05 |

15

20

25

Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido.

*Bacillus subtilis*. 10 µg/disco (6 mm de diámetro): NO ACTIVO.

30

Datos espectroscópicos

HRFABMS m/z 495,260410 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 495,260746 Δ 0,3 mmu); LRFABMS usando m-NBA como matriz m/z (intensidad relativa) 495 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (13), 460 (3), 391 (2); RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD 500 MHz): 6,67 (s, H-15), 6,5 (s, H-5), 3,73 (s, 7-OMe), 3,71 (s, 17-OMe), 2,29 (s, 16-Me), 2,24 (s, 6-Me), 1,13 (d, J= 7,1 Hz, H-26).

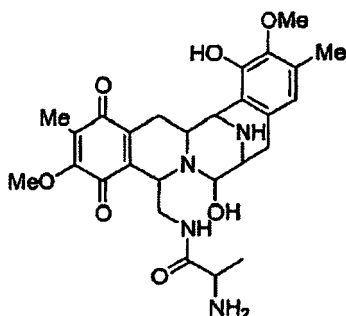
35

Nuevos compuestos de safracina obtenidos mediante desactivación

40

## SAFRACINA D

45



50

55

C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>  
Masa exacta: 526,24  
Peso molecular: 526,58  
C, 61,58; H, 6,51; N, 10,64; O, 21,27

60

65

Cepa

*sacI*<sup>-</sup> con reconstitución de la expresión de *sacJ* a partir de *P. fluorescens* A2-2 (PM-S1-007).

## ES 2 329 358 T3

### Condiciones de fermentación

Se vertieron 50 litros del medio SAM-7 (50 l) compuesto por dextrosa (3,2%), manitol (9,6%), levadura de cerveza seca (2%), sulfato de amonio (1,4%), fosfato secundario de potasio (0,03%), cloruro de potasio (0,8%), cloruro de hierro (III) 6-hidratado (0,001%), L-tirosina (0,1%), carbonato de calcio (0,8%), polipropilenglicol 2000 (0,05%) y antiespumante ASSAF 1000 (0,2%) en un fermentador en recipiente (Bioengineering LP-351) con una capacidad total de 75 l y, tras la esterilización, se añadieron antibióticos estériles (ampicilina 0,05 g/l y kanamicina 0,05 g/l). Entonces, se inoculó cultivo de siembra (2%) de la cepa mutante PM-S1-007. Se levó a cabo la fermentación durante 89 h. en condiciones aireadas y con agitación (1,0 l/min. y 500 rpm). Se controló la temperatura desde 27°C (desde la inoculación hasta 24 horas) hasta 25°C (desde 24 h hasta el proceso final). Se controló el pH a pH 6,0 mediante alimentación automática de ácido sulfúrico diluido desde 27 horas hasta el proceso final.

### Aislamiento

Tras la retirada de células mediante centrifugación, se ajustó el medio de cultivo (45 l) así obtenido hasta pH 9,5 con hidróxido de sodio diluido, se extrajo con 25 litros de acetato de etilo dos veces. Se llevó a cabo el mezclado en un recipiente con agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se separaron las dos fases mediante una centrifugadora líquido-líquido. Se congelaron las fases orgánicas a -20°C y se filtraron para eliminar el hielo y se evaporaron hasta la obtención de 35 g de extracto bruto oscuro de aceite. Tras una trituración con 5 l de hexano, se purificó el extracto (12,6 g) mediante una cromatografía en columna ultrarrápida (5,5 cm de diámetro, 20 cm de longitud) sobre una fase normal de sílice, fase móvil: acetato de etilo:MeOH: 1 l de cada uno de 1:0; 20:1; 10:1; 5:1 y 7:3. Se eluyeron fracciones de 250 ml y se combinaron dependiendo de la CFF (normal de sílice, EtOAc:MeOH 5:2, safracina D Rf 0,2, safracina E 0,05). Se evaporó la fracción que contenía safracina D y E impura a alto vacío (2,2 g). Fue necesaria una etapa de purificación adicional para separar D y E en condiciones similares (EtOAc:MeOH desde 1:0 hasta 5: 1), a partir de esto, se separan las fracciones que contienen safracina D y E y se evaporan y se realiza una purificación adicional mediante cromatografía en columna Sephadex LH-20 eluida con metanol. Se precipitaron de manera independiente las safracinas D y E obtenidas a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 ml) y hexano (1500 ml) como un sólido seco verde/amarillento (800 mg de safracina D) y (250 mg de safracina E).

### Actividades biológicas de safracina D

#### Exploración antitumoral

| Lineas celulares (mol/l)          |           |          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------------------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Exploración antitumoral           | Proteínas |          |          | Oligosac. |          |          | Medios   |          |          | SALINOS  |          |          | CORONA   |          |          |
|                                   | DM 10     | U-10     | SE-100   | HEP-2     | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    | HEP-2    |
| PM - Fermentado de la Cultura 200 | GBD       | 5,22E-05 | 1,54E-05 | 2,88E-05  | 1,33E-05 | 4,71E-05 | 3,51E-05 | 6,61E-05 | 6,61E-05 | 4,77E-05 | 4,33E-05 | 6,99E-05 | 4,78E-05 | 2,78E-05 | 2,28E-05 |
|                                   | YBI       | 9,93E-05 | 4,12E-05 | 3,02E-05  | 3,34E-05 | 7,82E-05 | 8,21E-05 | 1,07E-05 | 1,02E-05 | 1,19E-05 | 1,33E-05 | 1,82E-05 | 9,83E-05 | 3,88E-05 | 3,24E-05 |
| 19-AGO-02                         | LCB       | 1,90E-05 | 9,78E-05 | 1,25E-05  | 9,13E-05 | 4,30E-05 | 1,92E-05 | 1,89E-05 | 2,32E-05 | 1,88E-05 | 1,90E-05 | 1,90E-05 | 1,83E-05 | 1,19E-05 | 1,21E-05 |

| Evaluación secundaria (mol/l)     |           |      |          |          |          |          |          |            |
|-----------------------------------|-----------|------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| Exploración antitumoral           | SARABINOS |      |          | ADONIS   |          | MIRINOS  |          | CROCIDINOS |
|                                   | PROTEIN   | ADN  | ARN      | ALCOHOL  | GLUC     | ACTINA   | TUBULINA | HELOMIRIN  |
| PM - Fermentado de la Cultura 200 | 19-AGO-02 | C180 | 1,90E-05 | 1,52E-05 | 3,88E-05 | 2,85E-05 | 6,69E-05 |            |

Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido.

*Bacillus subtilis* 10 µg/disco (6 mm de diámetro): zona de inhibición: 15 mm de diámetro.

#### Datos espectroscópicos

ES-EM: m/z 509 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 6,50 (s, C-15), 4,02 (s, OMe), 3,73 (s, OMe), 2,22 (s, Me), 1,85 (s, Me), 0,80 (d, J = 7,2 Hz); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): 186,51, 181,15, 175,83, 156,59, 145,09,

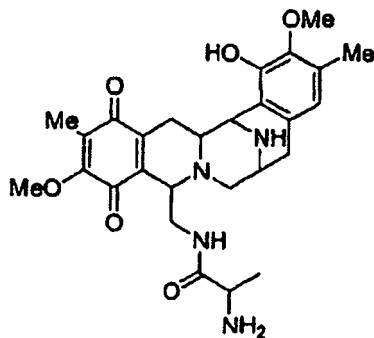
## ES 2 329 358 T3

142,59, 140,78, 137,84, 131,20, 129,01, 126,88, 121,57 (2 x C), 82,59, 60,92, 60,69, 53,12, 21,40, 50,68, 50,22, 48,68, 40,57, 29,60, 25,01, 21,46, 15,64, 8,44.

5

### SAFRACINA E

10



15

20

$C_{27}H_{34}N_4O_6$   
 Masa exacta: 510,25  
 Peso molecular: 510,58  
**C. 63,51; H. 6,71; N. 10,97; O. 18,80**

25

#### Cepa

30

La misma que safracina D.

#### Condiciones de fermentación

35

El mismo lote que safracina D.

#### Aislamiento

40

Véanse las condiciones de safracina D.

#### Actividades biológicas de safracina E

45

##### Exploración antitumoral

50

| Líneas celulares (mol/l)     |      |            |          |      |          |          |          |          |      |            |          |            |            |            |          |          |          |
|------------------------------|------|------------|----------|------|----------|----------|----------|----------|------|------------|----------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|
| Expiración                   | P388 |            | C630     |      | C638     |          | C640     |          | C642 |            | C644     |            | C646       |            |          |          |          |
|                              | 0010 | 1000       | 0200     | 1000 | 0200     | 1000     | 0200     | 1000     | 0200 | 1000       | 0200     | 1000       | 0200       | 1000       |          |          |          |
| FM - Fermento de la Cella 02 | 500  | 0.21E-05   | 3.03E-05 |      | 4.30E-05 | 4.54E-05 | 5.05E-05 | 3.54E-05 |      | 1.95E-05   | 4.23E-05 | 6.22E-05   | 7.93E-05   | 7.15E-05   | 5.07E-05 | 4.15E-05 | 4.02E-05 |
|                              | 700  | 1.90E-05   | 7.20E-05 |      | 8.95E-05 | 9.25E-05 | 9.24E-05 | 8.39E-05 |      | > 1.95E-05 | 8.21E-05 | 1.07E-05   | 1.95E-05   | > 1.95E-05 | 2.44E-05 | 7.29E-05 | 7.25E-05 |
| 19-AGQ-02                    | 1000 | > 1.95E-05 | 1.54E-05 |      | 1.70E-05 | 1.43E-05 | 1.70E-05 | 1.22E-05 |      | > 1.95E-05 | 1.95E-05 | > 1.95E-05 | > 1.95E-05 | > 1.95E-05 | 1.75E-05 | 1.20E-05 | 1.20E-05 |

55

60

| Evaluación secundaria (mol/l)       |                         |     |     |            |            |        |          |         |               |  |
|-------------------------------------|-------------------------|-----|-----|------------|------------|--------|----------|---------|---------------|--|
| Expiración secundaria               | SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS |     |     |            | PROTEÍNAS  |        | LÍPIDOS  |         | POLISACÁRIDOS |  |
|                                     | PROTEÍNA                | ADN | ARN | NUCLEÓSIDO | GLUC       | ACTINA | TUBULINA | GLUCOSA | FRUCTOSA      |  |
| FM - Fermento de la Cella 02-AGQ-02 | C150                    |     |     | 1.57E-05   | > 1.95E-05 |        |          |         |               |  |

65

## ES 2 329 358 T3

*Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido*

*Bacillus subtilis* 10 µg/disco (6 mm de diámetro): zona de inhibición de 9,5 mm.

5

*Datos espectroscópicos*

ES-EM: m/z 511 [M+H]<sup>+</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 6,51 (s, C-15), 4,04 (s, OMe), 3,75 (s, OMe), 2,23 (s, Me), 1,89 (s, Me), 0,84 (d, J = 6,6 Hz); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): 186,32, 181,28, 175,83, 156,43, 145,27, 142,75, 141,05, 137,00, 132,63, 128,67, 126,64, 122,00, 120,69, 60,69, 60,21, 59,12, 58,04, 57,89, 50,12, 49,20, 46,72, 39,88, 32,22, 25,33, 21,29, 15,44, 8,23.

10

Ejemplo 5

15

*Experimentos de alimentación cruzada*

*Expresión heteróloga de genes de precursores biosintéticos de safracina para la producción de P2 y P14*

20

En un intento por aclarar algo el mecanismo de la biosíntesis de P2 y P14 se clonaron y expresaron los genes de NRPS en sentido 3' para determinar su actividad bioquímica.

25

Para sobreproducir P14, se clonaron los genes *sacEFGH* (pB7983) (figura 4). Para sobreproducir P2 en un sistema heterólogo, se clonaron los genes de *sacD* a *sacH* (pB5H83) (figura 4). Para ello se amplificaron mediante PCR fragmentos que alojaban los genes de interés usando oligonucleótidos que contenían un sitio de restricción de XbaI en el extremo 5'. Se usaron los oligonucleótidos PFSC79 (5'-CGTCTAGACACCGGCTTCATGG-3') y PFSC83 (5'-GGTCTAGATAACAGGCAACAAACATA-3') para amplificar los genes de *sacE* a *sacH*; y se usaron los oligonucleótidos 5HPT1-XB (5'-CATCTAGACCGGACTGATATTCG-3') y PFSC83 (5'-GGTCTAGATAACAGCCAACAAACATA-3') para amplificar los genes de *sacD* a *sacH*. Se clonaron los fragmentos de PCR digeridos con XbaI en el sitio de restricción de XbaI del plásmido pBBR1-MCS2 (Kovach *et al*, Gene 1994, 166, 175-176). Se introdujeron por separado los dos plásmidos, pB7983 y pB5H83, en tres bacterias heterólogas *P. fluorescens* (CECT 378), *P. putida* (ATCC12633) y *P. stutzeri* (ATCC 17588) mediante conjugación (véase la tabla II). Cuando se comprobaron mediante análisis de HPLC caldos de cultivo de la fermentación de las cepas transconjugadas, se visualizaron grandes cantidades de compuesto P14 en las tres cepas que contenían plásmido pB7983, mientras que se observaron grandes cantidades de P2 y algo de producto P14 cuando se expresó el plásmido pB5H83 en las bacterias heterólogas.

35

*Alimentación cruzada*

40

Tal como se ha mostrado en el ejemplo 4, los mutantes *sacF*<sup>-</sup> (PM-S1-008) y *sacG* (PM-S1-009) no podían producir ni safracinas ni compuestos P2 y P14. La adición de P2 sintetizado químicamente a estos mutantes durante su fermentación proporciona la producción de safracina.

45

Además, el cultivo conjunto de una cepa heteróloga de *P. stutzeri* (ATCC 17588) que aloja plásmido pBSH83 (PM-18-004), cuya expresión produce P2 y P14, con uno cualquiera de los dos mutantes *sacF*<sup>-</sup> y *sacG*<sup>-</sup> dio como resultado la producción de safracina. El cultivo conjunto de una cepa heteróloga *P. stutzeri* (ATCC 17588) que aloja plásmido pB37983 (PM-18-005), cuya expresión produce sólo P14, con uno cualquiera de los dos mutantes de *P. fluorescens* A2-2 mencionados anteriormente no dio como resultado ninguna producción de safracina en absoluto. Estos resultados sugieren que P14 se transforma en P2, una molécula que puede transportarse fácilmente al interior y al exterior de la pared celular de *Pseudomonas sp.* y cuya presencia es absolutamente necesaria para la biosíntesis de safracina.

50

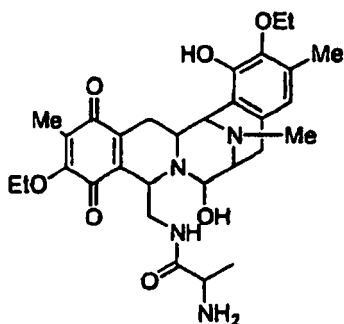
Ejemplo 6

*Producción biológica de nuevas moléculas "no naturales"*

60

La adición de 2 g/l de un precursor derivado de P2 modificado específico, P3, una 3-hidroxi-5-metil-O-etiltirosina, a la fermentación de mutante *sacF* (PM-S1-008) produjo dos safracinas "no naturales" que incorporaban el precursor P3 modificado en su estructura, safracina A(OEt) y safracina B(OEt).

65

**SAFRACINA B-Etoxilo (safracina B(OEt))**

$C_{30}H_{40}N_4O_7$   
 Masa exacta: 568,29  
 Peso molecular: 568,66  
 C, 63,36; H, 7,09; N, 9,85; O, 19,69

*Cepa*

Mutante *safF*<sup>-</sup> de *P. fluorescens* A2-2 (PM-S1-008).

*Condiciones de fermentación*

A un medio de siembra que contenía el 1% de glucosa; el 0,25% de extracto de ternera; el 0,5% de bactopectona; el 0,25% de NaCl; el 0,8% de CaCO<sub>3</sub> se le inoculó el 0,1% de una reserva vegetativa congelada del microorganismo, y se incubó en un agitador rotativo (250 rpm) a 27°C. Tras 30 h de incubación, se transfirió el 2% (v/v) del cultivo de siembra del mutante PM-S1-008 a matraces Erlenmeyer de 2000 ml que contenían 250 ml del medio de producción M-16 B, compuesto por el 15,2% de manitol; el 3,5% de levadura de cerveza seca; el 1,4% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; el 0,001% de FeCl<sub>3</sub>; el 2,6% de CO<sub>3</sub>Ca y el 0,2% de P3 (3-hidroxi-5-metil-O-metiltirosina). La temperatura de la incubación fue de 27°C desde la inoculación hasta 40 horas y después, de 24°C hasta el proceso final (71 horas). No se controló el pH. La agitación del agitador rotativo fue de 220 rpm con 5 cm de excentricidad.

*Aislamiento*

Se juntaron 4 matraces Erlenmeyer de 2000 ml con 250 ml cada uno (970 ml), se centrifugaron (12.000 rpm, 4°C, 10 min., centrifugadora J2-21 de BECKMAN) para retirar células. Se ajustó el caldo aclarado (765 ml) hasta pH 9,0 mediante NaOH al 10%. Después, se extrajo el caldo aclarado con álcali con 1:1 (v/v) de EtOAc (x2). Se evaporó la fase orgánica a alto vacío y se obtuvo un extracto oscuro grasiento (302 mg).

Se lavó este extracto mediante una trituración con hexano para eliminar impurezas y se purificaron los sólidos mediante una columna cromatográfica usando una fase normal de sílice y una mezcla de acetato de etilo:metanol (desde 12:1 hasta 1:1). Se analizaron las fracciones con UV en CCF (sílice 60, fase móvil EtOAc:MeOH 5:4. Rf 0,3 safracina B-OEt y 0,15 safracina A-OEt). A partir de esto, se obtuvieron safracina B OEt (25 mg) y safracina A OEt (20 mg).

# ES 2 329 358 T3

Actividades biológicas de safracina B (OEt)

Actividades antitumorales

5

| Lineas celulares (mol/l)      |          |          |            |          |          |          |          |          |          |          |          |            |            |          |          |
|-------------------------------|----------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|----------|----------|
| Experimento<br>Principio      | Paciente |          | Ovario     |          |          | Mama     |          | Mucosa   |          | Piel     |          | Colon      |            | Células  |          |
|                               | ORG.     | LINEA    | MEQ        | MDP      | MDM      | MEQ      | MEQ      | MEQ      | MEQ      | MEQ      | MEQ      | MEQ        | MEQ        | MEQ      | MEQ      |
| safracina B Etod<br>23-OCT-02 | 650      | 4.01E-03 | 4.01E-03   | 4.01E-03 | 8.02E-07 | 1.62E-03 | 1.62E-07 | 1.62E-07 | 5.01E-07 | 3.97E-06 | 6.41E-07 | 2.40E-07   | 4.02E-07   | 2.02E-06 | 1.92E-03 |
|                               | 750      | 1.01E-05 | > 1.75E-05 |          | 3.97E-06 | 1.92E-06 | 1.92E-07 | 4.02E-03 | 1.16E-05 | 1.08E-07 | 2.02E-06 | 1.39E-06   | 1.03E-06   | 9.80E-06 | 3.15E-07 |
|                               | 1050     | 1.03E-05 | 4.02E-07   |          | 4.27E-06 | 6.37E-06 | 1.02E-06 | 1.39E-06 | 3.06E-06 | 3.89E-06 | 1.39E-06 | > 1.75E-05 | > 1.75E-05 | 1.39E-06 | 9.76E-07 |

10

15

| Evaluación secundaria (mol/l) |          |                        |          |          |                      |          |                     |         |          |
|-------------------------------|----------|------------------------|----------|----------|----------------------|----------|---------------------|---------|----------|
| Experimento<br>Principio      | Paciente | Moléculas de proteínas |          |          | Moléculas de lípidos |          | Moléculas de azúcar |         |          |
|                               |          | PROTEIN                | ADN      | ARN      | COLESTEROL           | GLUCOSA  | ACTINA              | ALBUMIN | GLUCOSAM |
| 10-OCT-02                     | C150     | > 1.75E-05             | 1.92E-06 | 1.92E-07 | 5.29E-03             | 1.75E-06 |                     |         |          |

20

25

Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido.

*Bacillus subtilis* 10 µg/disco (6 mm de diámetro): zona de inhibición de 17,5 mm.

30

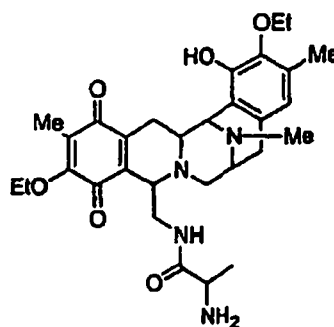
Datos espectroscópicos

35

ES-EM: m/z 551 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 6,48 (s, H-15), 2,31 (s, 16-Me), 2,22 (s, 12-NMe), 1,88 (s, 6-Me), 1,43 (t, J = 6,9 Hz, Me-Etoxilo), 1,35 (t, J = 6,9 Hz, Me-Etoxilo), 0,81 (d, J = 7,2 Hz, H-26).

## SAFRACINA A-Etoxilo (Safracina A (OEt))

40



45

50

$C_{30}H_{40}N_4O_6$   
Masa exacta: 552,29  
Peso molecular: 552,66  
C, 65,20; H, 7,30; N, 10,14; O, 17,37

55

*Cepa*

60

La misma que para safracina B (OEt).

Condiciones de fermentación

65

Las mismas que para safracina B (OEt).

## ES 2 329 358 T3

### Aislamiento

Se juntaron 4 matraces Erlenmeyer de 2000 ml con 250 ml cada uno (970 ml), se centrifugaron (12.000 rpm, 4°C, 10 min., centrifugadora J2-21 de BECKMAN) para retirar las células. Se ajustó el caldo aclarado (765 ml) hasta pH 9,0 mediante NaOH al 10%. Después, se extrajo el caldo aclarado con álcali con 1:1 (v/v) de EtOAc (x2). Se evaporó la fase orgánica a alto vacío y se obtuvo un extracto oscuro grasiento (302 mg).

Se lavó este extracto mediante trituración con hexano para eliminar impurezas y se purificaron los sólidos mediante una columna cromatográfica usando fase normal de sílice y una mezcla de acetato de etilo:metanol (desde 12:1 hasta 1:1). Se analizaron las fracciones con UV en CCF (sílice 60, fase móvil EtOAc:MeOH 5:4. Rf 0,3 safracina B-OEt y 0,15 safracina A-OEt). A partir de esto, se obtuvieron safracina B OEt (25 mg) y safracina A OEt (20 mg).

### Actividades biológicas de safracina A (OEt)

#### Actividades antitumorales

| Lineas celulares (mol/l)             |      |          |          |       |          |          |          |          |       |          |          |          |          |          |          |                  |          |
|--------------------------------------|------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------|----------|
| Experimento<br>Células               | Fase | Ovca-1   |          |       |          |          |          | MCF-7    |       |          | MCF-10   |          |          | MCF-7    |          | Células<br>MCF-7 |          |
|                                      |      | 10-18    | 11-07    | 12-07 | 13-07    | 14-07    | 15-07    | 16-07    | 17-07 | 18-07    | 19-07    | 20-07    | 21-07    | 22-07    |          |                  |          |
| safracina A etoxi (OEt)<br>23-OCT-02 | BD   | 2.81E-06 | 3.78E-07 |       | 1.82E-07 | 2.01E-05 | 5.82E-07 | 7.35E-07 |       | 4.03E-05 | 1.11E-07 | 3.85E-06 | 1.97E-06 | 2.00E-06 | 5.72E-06 | 1.82E-06         | 7.84E-07 |
|                                      | TH   | 5.33E-06 | 7.82E-07 |       | 9.20E-07 | 5.89E-06 | 1.95E-06 | 1.90E-06 |       | 7.77E-06 | 6.85E-07 | 5.93E-06 | 4.41E-06 | 4.41E-06 | 9.84E-06 | 2.91E-06         | 2.20E-06 |
|                                      | 1C9  | 1.10E-06 | 1.03E-06 |       | 1.97E-06 | 1.28E-05 | 5.57E-06 | 5.77E-06 |       | 1.28E-05 | 1.61E-06 | 1.19E-06 | 3.05E-06 | 5.61E-06 | 1.83E-05 | 7.85E-06         | 6.63E-06 |

| Evaluación secundaria (mol/l) |         |       |       |       |        |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|---------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Experimento<br>Secundaria     | Células | MCF-7 |       |       | MCF-10 |       | MCF-7 |       | MCF-7 |       |
|                               |         | 10-18 | 11-07 | 12-07 | 13-07  | 14-07 | 15-07 | 16-07 | 17-07 | 18-07 |
| 10-OCT-02                     | C180    |       |       |       |        |       |       |       |       |       |

Actividad antimicrobiana: sobre medio sólido.

*Bacillus subtilis* 10 µg/disco (6 mm de diámetro): zona de inhibición de 10 mm.

#### Datos espectroscópicos

ES-EM: m/z 553 [M+H]<sup>+</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 6,48 (s, H-15), 2,33 (s, 16-Me), 2,21 (s, 12-NMe), 1,88 (s, 6-Me), 1,42 (t, J = 6,9 Hz, Me-Etoxilo), 1,34 (t, J = 6,9 Hz, Me-Etoxilo), 0,8 (d, J = 6,9 Hz, H-26).

### Ejemplo 7

#### Transformación enzimática de safracina B para dar safracina A

Con el fin de someter a ensayo la actividad enzimática de la conversión safracina B para dar safracina A, se recogieron cultivos de fermentación de 120 horas (véanse las condiciones en el ejemplo 2 ensayo biológico (bioprueba) para determinar la producción de safracina) de diferentes cepas y se centrifugaron (9.000 rpm x 20 min.). Las cepas sometidas a ensayo fueron *P. fluorescens* A2-2, como cepa de tipo natural, y *P. fluorescens* CECT378 + pBHPT3 (PM-19-006), como huésped de expresión heterólogo. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las células (NaCl al 0,9%) dos veces y volvieron a suspenderse en 60 ml de tampón fosfato 100 mM pH 7,2. Se distribuyeron 20 ml de la suspensión celular en tres matraces Erlenmeyer:

- A. Suspensión celular + safracina B (400 mg/L).
- B. Suspensión celular calentada a 100°C durante 10 min. + safracina B (400 mg/l) (control negativo).
- C. Suspensión celular sin safracina B (control negativo).

## ES 2 329 358 T3

Se incubó la reacción bioquímica a 27°C a 220 rpm y se tomaron muestras cada 10 min. Se realizó un seguimiento de la transformación de safracina B para dar safracina A mediante HPLC. Los resultados demostraron claramente que el gen clonado en pBHPT3, *sacH*, codifica una proteína responsable de la transformación de safracina B para dar safracina A.

5

Basándose en estos resultados se realizó un ensayo para hallar si esta misma enzima podía reconocer un sustrato diferente tal como ecteinascidina 743 (ET-743) y transformar este compuesto para dar Et-745 (faltando el hidroxilo en C-21). Se repitió el experimento anterior para obtener matraces Erlenmeyer que contenían:

- 10
- A. Suspensión celular + ET-743 (567 mg/l aprox.).
  - B. Suspensión celular calentada a 100°C durante 10 min. + ET-743(567 mg/L) (control negativo).
  - C. Suspensión celular sin ET-743 (control negativo).

15

Se incubó la reacción bioquímica a 27°C a 220 rpm y se tomaron muestras a 0, 10 min., 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 20 h, 40 h, 44 h, 48 h. Se realizó un seguimiento de la transformación de ET-743 para dar ET-745 mediante HPLC. Los resultados demostraron claramente que el gen clonado en pBHPT3, *sacH*, codifica una proteína responsable de la transformación de Et-743 para dar Et-745. Esto demuestra que esta enzima reconoce ecteinascidina como sustrato y que puede usarse en la biotransformación de una amplia gama de estructuras.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende:

- 5 a) SEQ ID NO: 1, una variante o parte de la misma que codifica al menos un polipéptido que cataliza al menos una etapa de la biosíntesis de safracinas o
- b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia en a).

10 2. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende al menos uno de los genes *sacA*, *sacB*, *sacC*, *sacD*, *sacE*, *sacF*, *sacG*, *sacH*, *sacI* o *sacJ*, que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-11, incluyendo variantes o partes de la misma, en la que las variantes o partes codifican un polipéptido que conserva la actividad biológica del polipéptido respectivo.

15 3. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos uno de los operones *sacABCDEFGH* o *sacIJ* que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-9 y SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente.

20 4. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 3, que comprende al menos el operón *sacABCDEFGH* que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-9.

25 5. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende los genes *sacA*, *sacB*, *sacC*, *sacD*, *sacE*, *sacF*, *sacG*, *sacH*, *sacI* y *sacJ* que codifican secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-11, incluyendo variantes o partes de la misma, en la que las variantes o partes codifican un polipéptido que conserva la actividad biológica del polipéptido respectivo.

30 6. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende los genes *sacA*, *sacB*, *sacC*, *sacD*, *sacE*, *sacF*, *sacG*, *sacH*, *sacI*, *sacJ*, *orf1*, *orf2*, *orf3* y *orf4* que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-15, variantes o partes de la misma, en la que las variantes o partes codifican un polipéptido que conserva la actividad biológica del polipéptido respectivo.

35 7. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el gen *sacI* está interrumpido.

8. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el gen *sacJ* está interrumpido.

40 9. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el gen *sacI* está interrumpido y la expresión del gen *sacJ* se ha reconstituido.

10. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que los genes *sacF* o *sacG* se han interrumpido.

45 11. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico codifica un polipéptido que es idéntico en al menos el 30% en la secuencia de aminoácidos a un polipéptido tal como se define por las SEQ ID NO: 2-15 o una variante o parte de la misma que conserva la actividad biológica del polipéptido respectivo.

50 12. Ácido nucleico según la reivindicación 11, en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido tal como se define por las SEQ ID NO: 2-15.

13. Secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la parte tiene al menos 50 nucleótidos de longitud.

55 14. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende:

- 60 a) SEQ ID NO: 1; o
- b) al menos uno de los genes *sacA*, *sacB*, *sacC*, *sacD*, *sacE*, *sacF*, *sacG*, *sacH*, *sacI* o *sacJ* que codifican secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-11; o
- c) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido definido en las SEQ ID NO: 2-11; o
- 65 d) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a las secuencias en a), b) o c).

## ES 2 329 358 T3

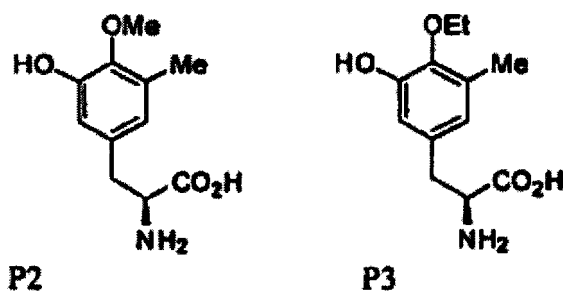
15. Una sonda de hibridación que puede hibridarse en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1 y que tiene al menos 15 nucleótidos.
- 5 16. Sonda de hibridación según la reivindicación 15, que comprende una secuencia de entre 25 y 60 residuos de nucleótido.
17. Uso de una sonda de hibridación según una cualquiera de las reivindicaciones 15-16, en la detección de un gen de safracina o ecteinascidina.
- 10 18. Uso según la reivindicación 17, en el que la detección del gen se realiza en *Ecteinascidia turbinata*.
19. Polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 15 20. Polipéptido según la reivindicación 19, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-15.
21. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 20 22. Vector según la reivindicación 21, que es un vector de expresión.
23. Vector según la reivindicación 22, que es un cósmido.
- 25 24. Una célula huésped transformada con una o más de las secuencias de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
25. Una célula huésped que comprende un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 21-23.
- 30 26. Célula huésped según la reivindicación 25, en la que la célula huésped se transforma con un ácido nucleico exógeno que comprende una agrupación de genes que codifica polipéptidos suficiente para dirigir la síntesis de una safracina.
- 35 27. Célula huésped según las reivindicaciones 24 a 26, que es un microorganismo.
28. Célula huésped según la reivindicación 27, que es una bacteria.
29. Método de producción de un compuesto de safracina o análogo de safracina que comprende:
- 40 a. cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en un medio de cultivo adecuado y en condiciones que permiten que las células proliferen;
- b. recuperar el medio de cultivo y
- 45 c. purificar el compuesto de safracina del medio de cultivo.
30. Método según la reivindicación 29, en el que dicha célula huésped comprende un vector que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 50 31. Método según la reivindicación 30, en el que dicha célula huésped comprende un vector que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y al menos uno de los genes *sacF*, *sacG*, *sacI* o *sacJ* está interrumpido.
- 55 32. Método según la reivindicación 31, en el que el gen *sacI* está interrumpido.
33. Método según la reivindicación 31, en el que el gen *sacJ* está interrumpido.
- 60 34. Método según la reivindicación 31, en el que el gen *sacI* está interrumpido y la expresión del gen *sacJ* se ha reconstituido.

35. Método según la reivindicación 31, en el que el gen *sacF* o el gen *sacG* está interrumpido y se usa P2 o P3 en el medio de cultivo, que tienen las siguientes estructuras:

5

10

15



20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

36. Un método de producción de un compuesto de safracina o análogo de safracina que comprende fermentar un organismo en el que el número de copias de la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1 se ha aumentado.

37. Un método de producción de un compuesto de safracina o análogo de safracina que comprende fermentar un organismo en el que la expresión de genes que codifican polipéptidos suficiente para dirigir la síntesis de una safracina o análogo de safracina se ha modulado mediante manipulación o sustitución de uno o más genes o secuencia responsable de regular tal expresión en el que los genes que codifican los polipéptidos comprenden un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

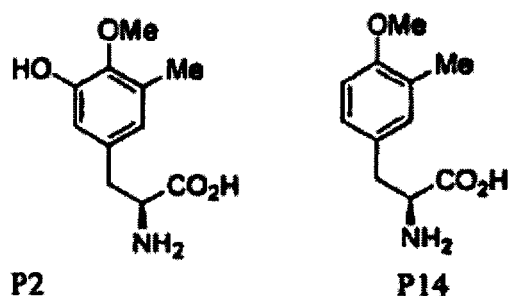
38. Un método de producción de un compuesto de safracina o análogo de safracina que comprende poner en contacto un compuesto que es un sustrato para un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, con dicho polipéptido, en el que el polipéptido modifica químicamente el compuesto.

39. Método según las reivindicaciones 36 a 38, en el que el organismo es *Pseudomonas sp.*

40. Una composición que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

41. Uso de una composición según la reivindicación 40, para la biosíntesis combinatoria de una o más péptido sintetasas no ribosómicas, anillos de dicetopiperazina y safracinas.

42. Uso según la reivindicación 41, en el que se usa como precursor al menos uno de los compuestos que se muestran a continuación, análogos o derivados de los mismos:



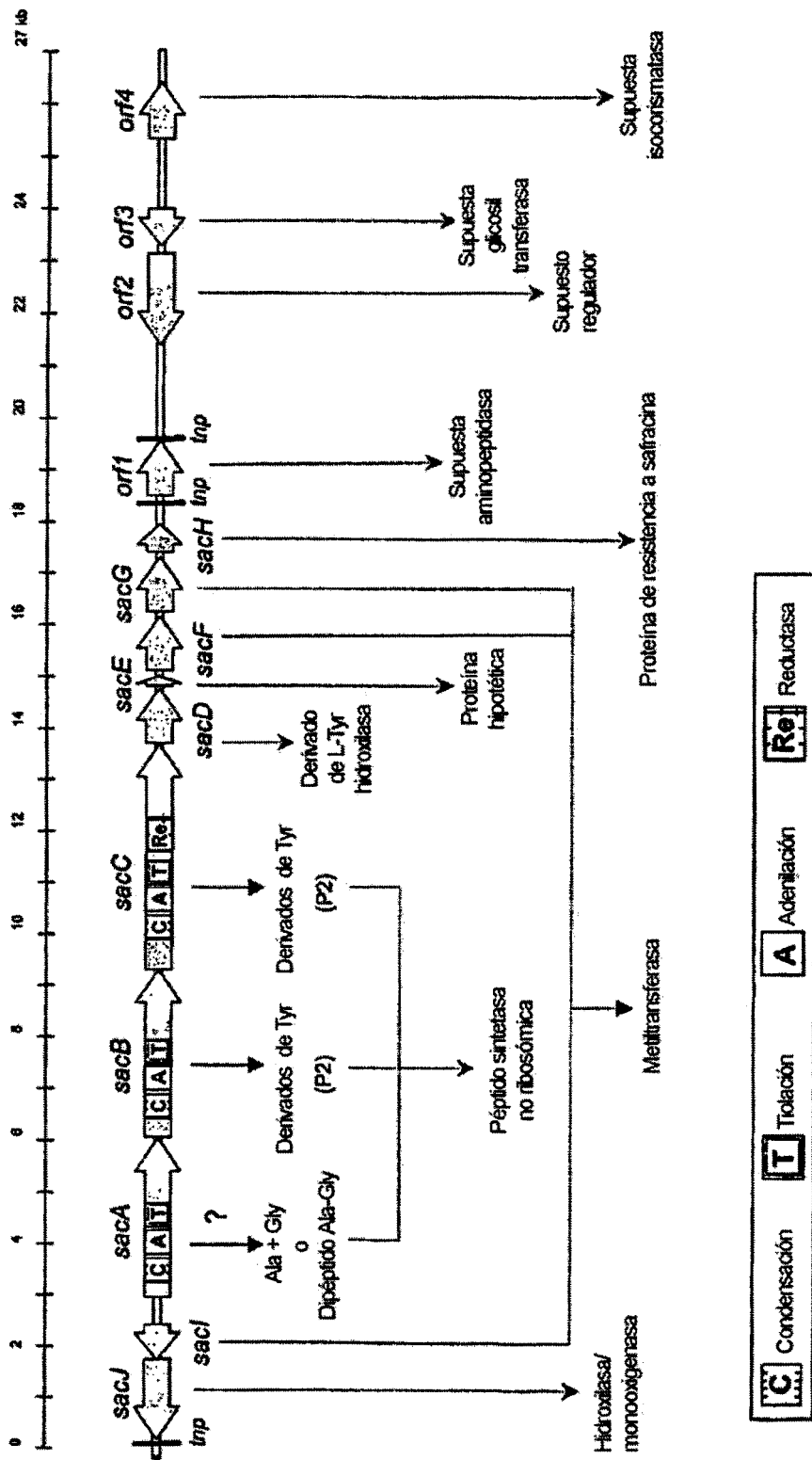


Figura 1

| Núcleo     | 1                | 2                 | 3                  | 4            | 5              | 6                        |
|------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------|----------------|--------------------------|
| Secuencia  | LKAGGA           | SGTIG             | GELCIGG            | TGD          | RIELGEIE       | LGCHS                    |
| Safb1 97   | -LYAGVVAVVYP-78  | -YTSGSTADPKG-220  | -GEIWRGSPVAQGY-23  | -LRTGDL-23   | -NYYPQDLEL-163 | -LPDLGLDLSLALVELKHRIE-   |
| Safb2 1247 | -LEAGGVAVPLDP-64 | -YTSGSTGQPKG-172  | -GELFIGGAVARGY-24  | -YRTGDL-23   | -FRIEFEIE-121  | -FFDLGCNSLLATRLATRLA-    |
| Safa1 559  | -LKAGGAYVPLDP-64 | -YTSGSSGRPKG-173  | -GELFIGSGVARGY-24  | -YRTGDL-23   | -YRIELABIE-121 | -FFEFGNSLLAGRLVEELD-     |
| Safa2 1668 | -LKAGGAYVPLDP-67 | -YTSGSTGTFKA-179  | -GELFVGGVGLARGY-24 | -YRTGDL-23   | -YRVELGEIE-122 | -FFEVGTSLLARLASRLI-      |
| Saca 483   | -MACGGYVPLSD-63  | -FTSGSTGEPKG-172  | -GELIINGHVAQGY-20  | -YRTGDR-23   | -FRVELGPVQ-121 | -FLDIGGHSLSLTHLTGILLR-   |
| Sacb 524   | -NQGGIYVLSK-63   | -YTSGSTQKPKG-173  | -GELIICGPGVSGGY-22 | -YLTGDR-23   | -HRIELGEIE-123 | -FFQLGCHSILVARMVERIE-    |
| Sacc 515   | -RAGHAFLPIDPR-62 | -YTSGSTGVFPKG-178 | -GEIMLAGQNLARGY-21 | -YATGDL-23   | -HRIELNEVA-122 | -FFEQCGNSILLTRLAGTIS-    |
| FUNCIÓN    | desconocida      | unión a ATP       | unión a ATP        | motor ATPasa | unión a ATP    | unión a 4'fosforatetaina |

Figura 2

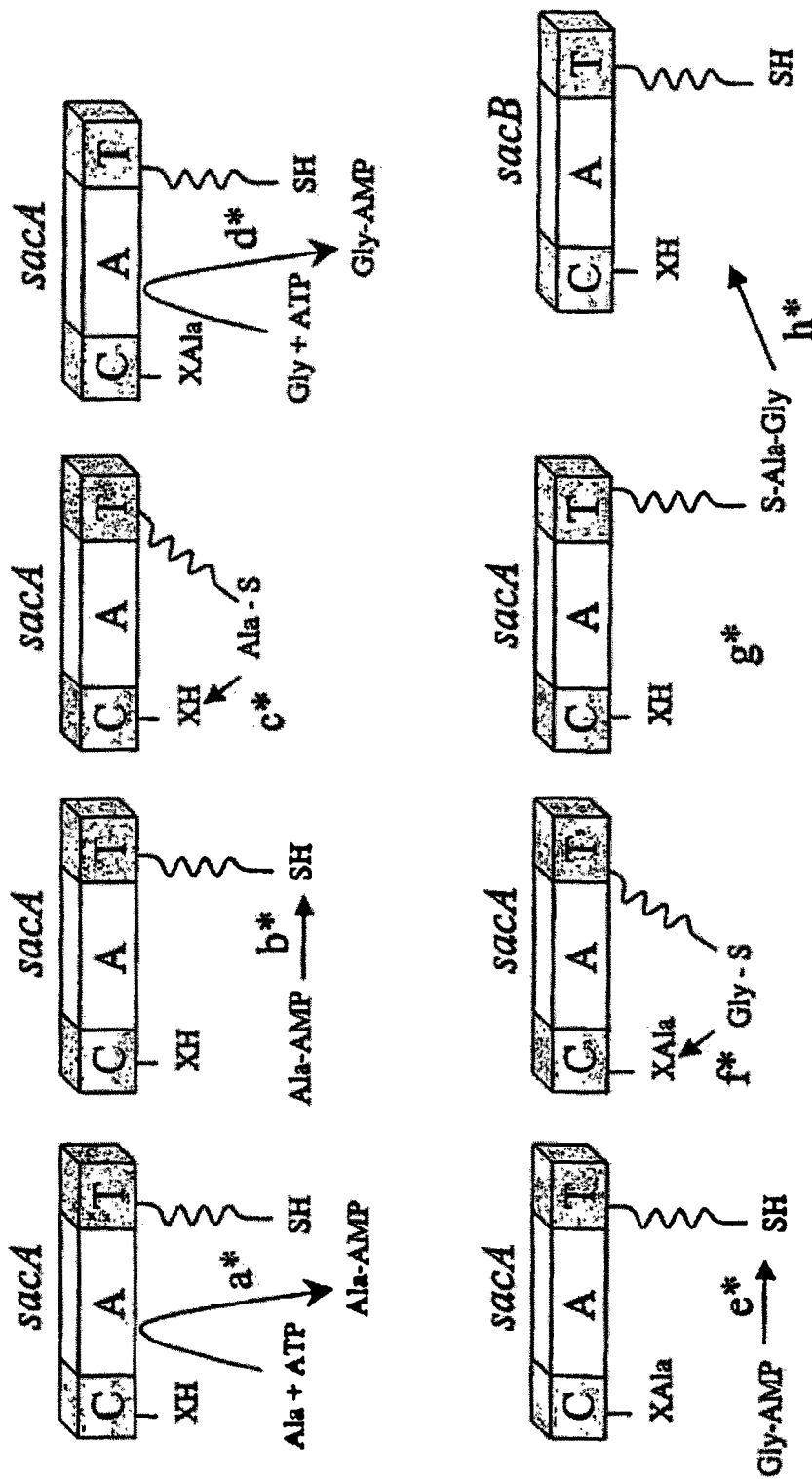


Figure 3

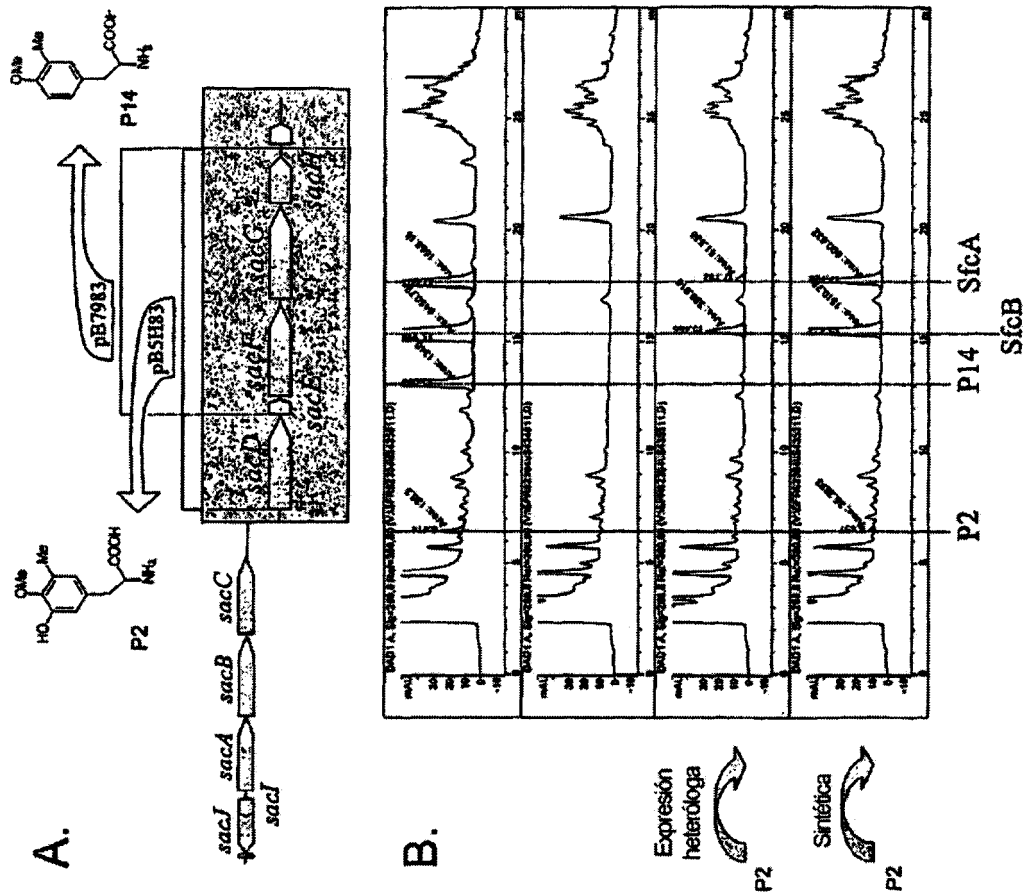


Figura 4

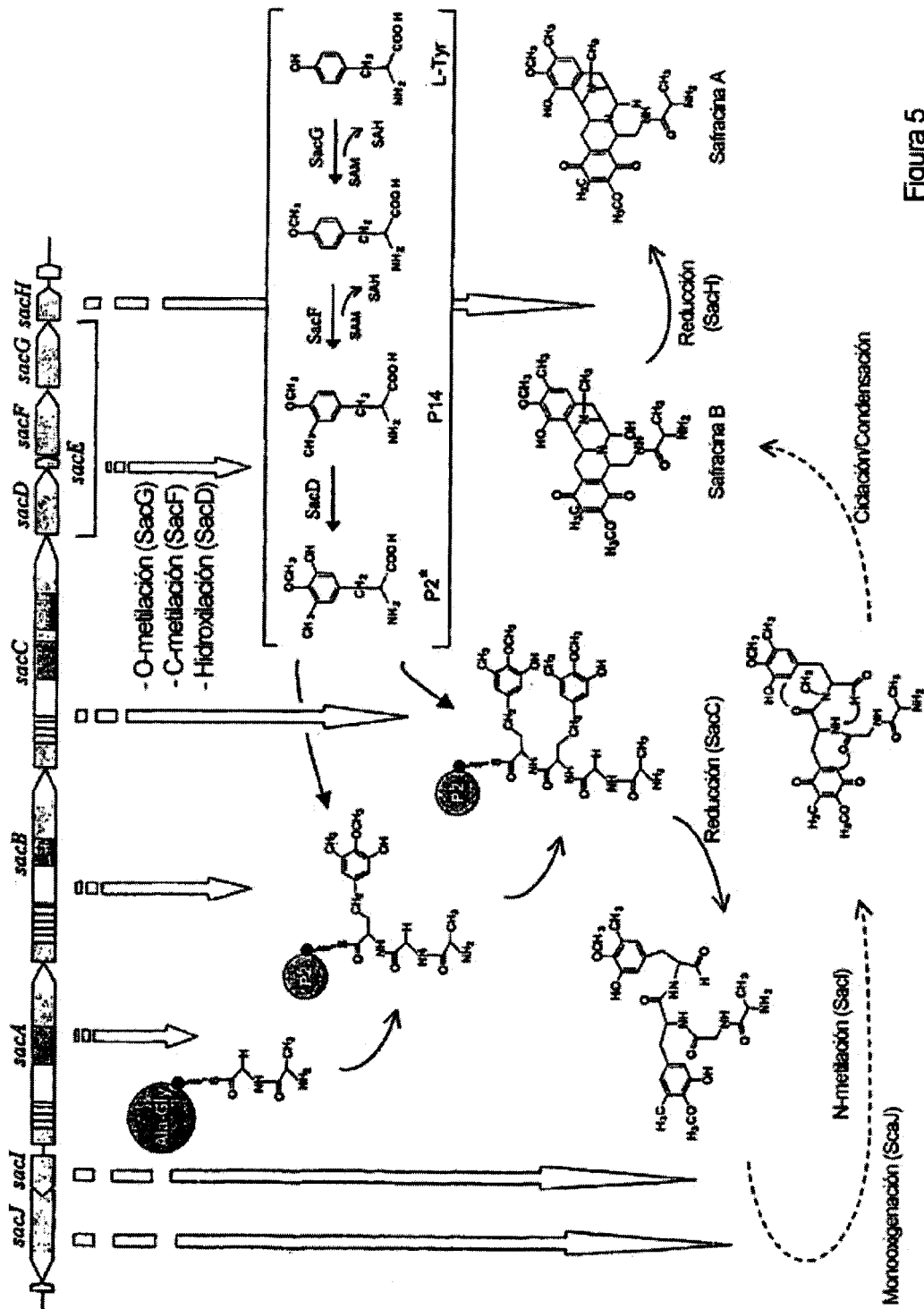


Figura 5

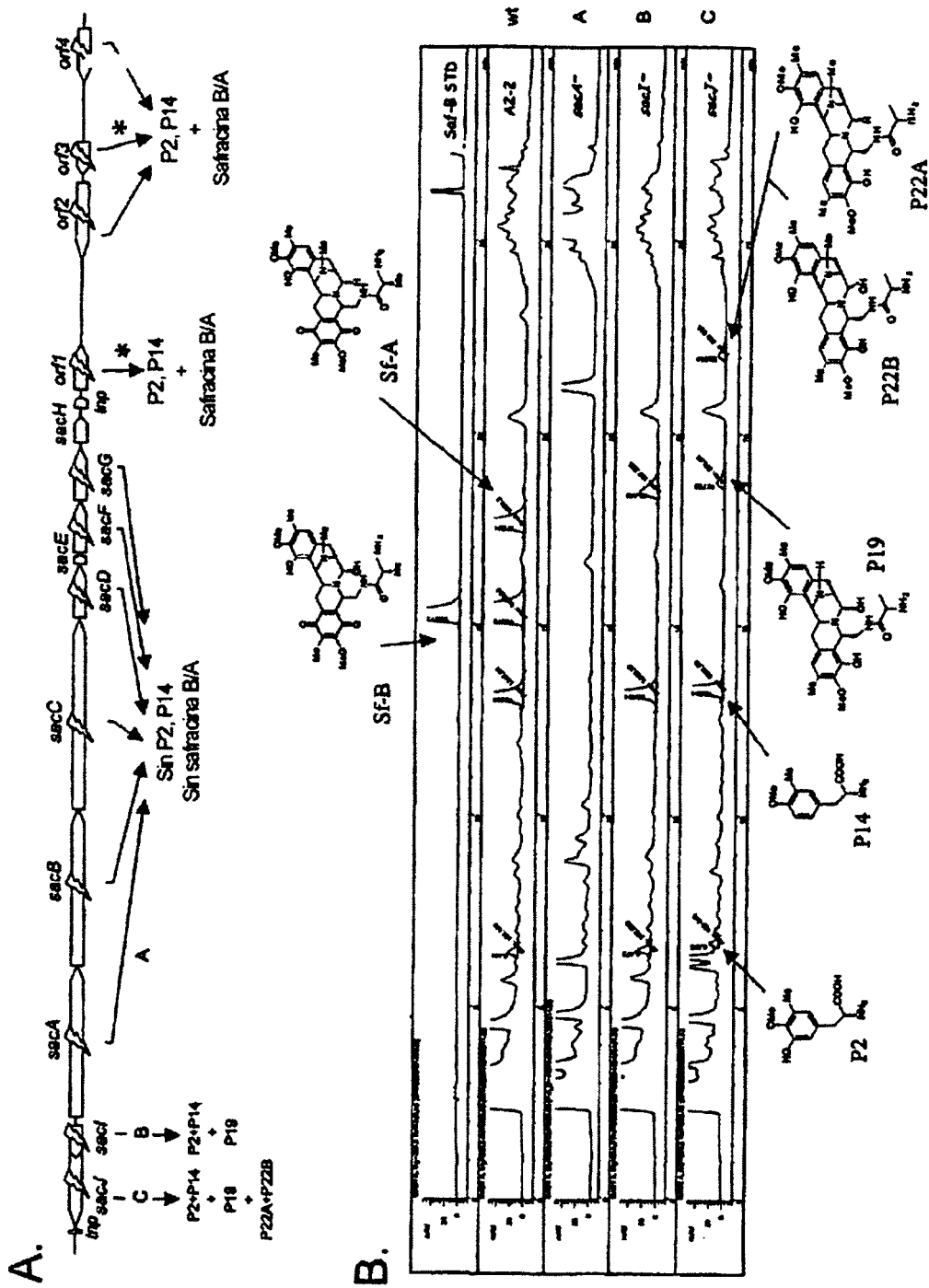


Figura 6

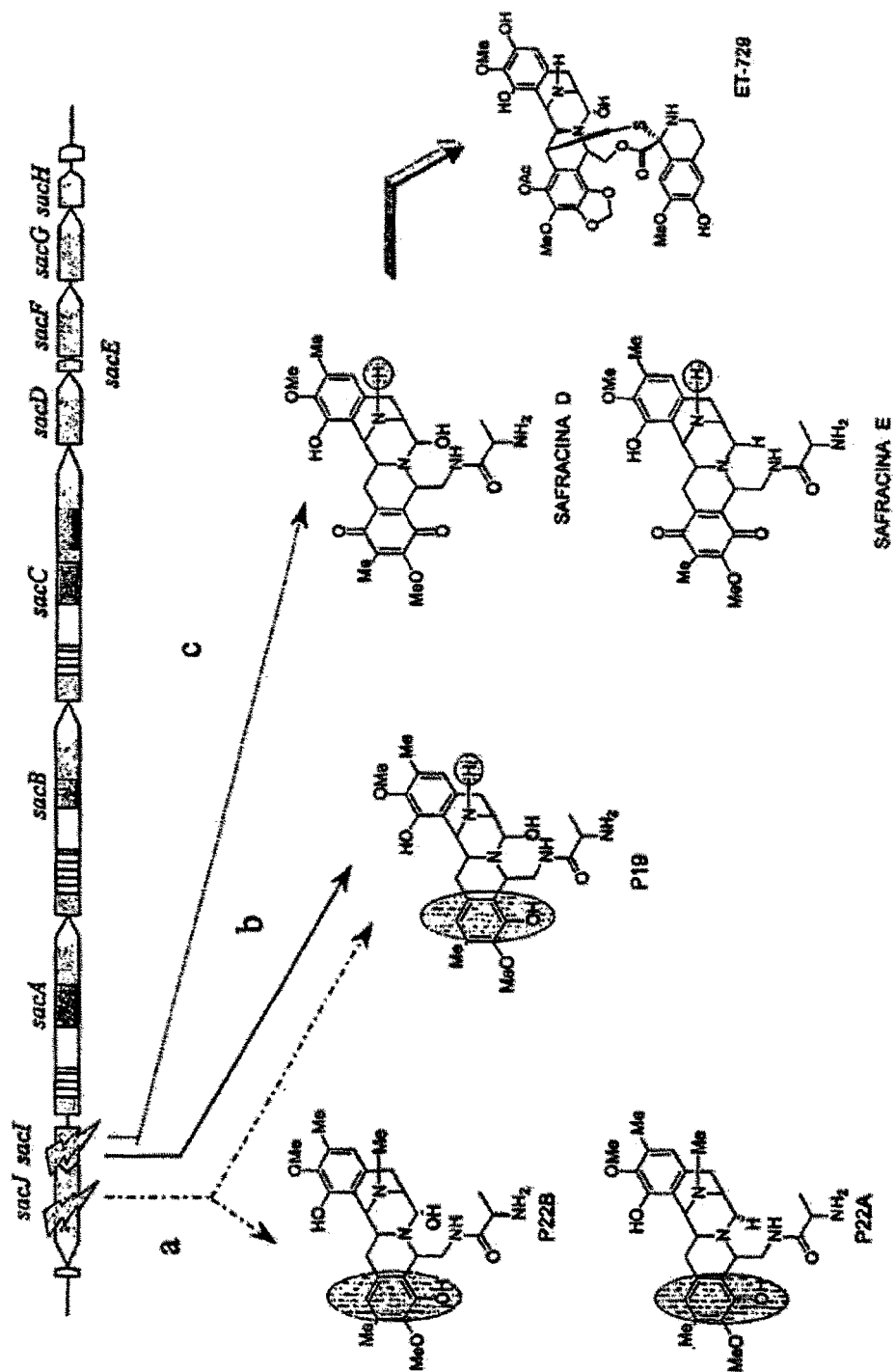
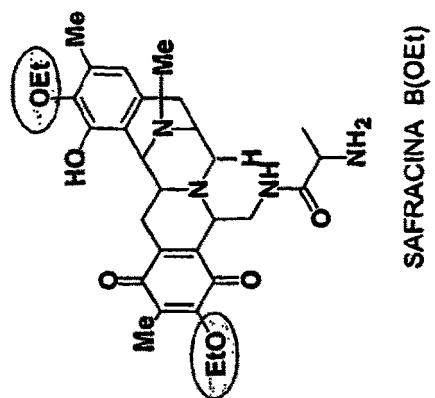


Figura 7



+

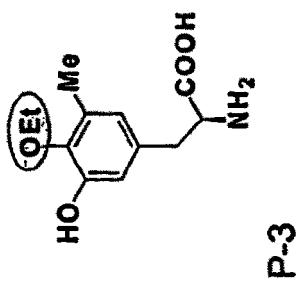
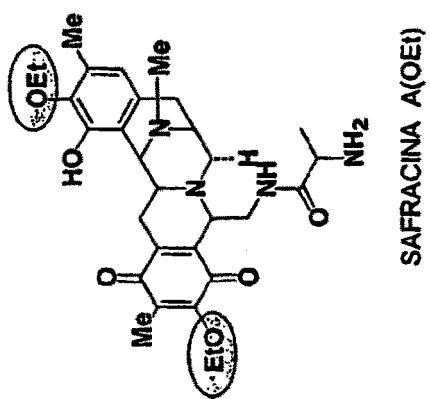


Figura 8

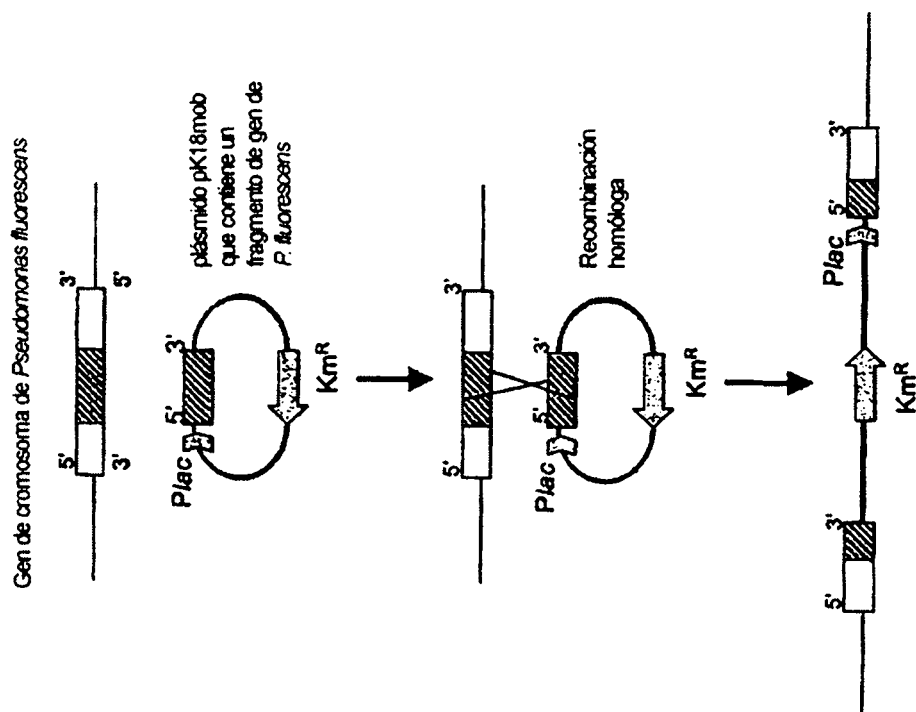


Figura 9

# ES 2 329 358 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pharma Mar  
5 <120> Agrupación de genes implicados en la biosíntesis de safracina y sus usos para ingeniería genética  
<130> aaa  
<160> 15  
<170> PatentIn versión 3.1  
10 <210> SEQ ID 1  
<211> Longitud: 26705  
<212> Tipo ADN  
15 <213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2  
  
<220> Característica:  
<221> NOMBRE/CLAVE: *sacB*  
20 <222> UBICACIÓN: (6080)..(9268)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: gen de péptido sintetasa no ribosómica  
  
25 <220>  
<221> *sacC*  
<222> (9275)..(13570)  
<223> gen de péptido sintetasa no ribosómica  
30 <220>  
<221> *sacD*  
<222> (13602)..(14651)  
35 <223> Gen de proteína hipotético  
  
<220>  
40 <221> *sacE*  
<222> (14719)..(14901)  
<223> Gen de proteína hipotético  
  
45 <220>  
<221> *sacF*  
<222> (14962)..(16026)  
<223> gen de proteína metil-transferasa  
50 <220>  
<221> *sacG*  
<222> (16115)..(17155)  
55 <223> gen de proteína metil-transferasa  
  
<220>  
60 <221> *sacH*  
<222> (17244)..(17783)  
<223> gen de proteína hipotético  
  
65 <220>  
<221> *sacI*

## ES 2 329 358 T3

<222> (1854)..(2513)  
<223> Gen de proteína metil-transferasa, complementario

5 <220>  
<221> *sacJ*  
<222> (335)..(1861)  
<223> Gen de proteína monooxigenasa, complementario

10 <220>  
<221> orf1  
<222> (18322)..(19365)  
<223> proteína similar a aminoácido peptidasa

15 <220>  
<221> orf2  
<222> (21169)..(22885)  
<223> proteína reguladora similar a hox, complementaria

20 <220>  
<221> orf3  
<222> (23041)..(23730)  
<223> proteína similar a glicosil transferasa, complementaria

25 <220>  
<221> orf4  
<222> (25037)..(26095)  
<223> proteína similar a isocorismatasa

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 329 358 T3

<400> SECUENCIA 1

5  
ctgcagggtgg tttgcgcgcg gaagacccgc cactgcccgt gcgctcgttt gaattgcaca 60  
tggcgtggcg tgggtcgag gataatgac egggggagcg gtggttgcgg tcgeggattc 120  
10 agatgttttt tggcgacccc gatagccttt aattaaactc cactaaaatc ggcgattgca 180  
gagcctgagt acaacacggc tactggactg aagtgggagc atcgtgccgc atagccatag 240  
15 tgatctcggg gtgtctcgcc atgtcccggc ccaggtcgta ggtcatgctc ttgagcattg 300  
ccagcatctt cgtgctccct tgccagctgt ttcaggtcag gctctgacgc gcggatttag 360  
aatcgtccag cagccactca cccaagcgt ccttggccaa ggtcgatttt ttaccgaccc 420  
20 agatcaccac gccatccggc ctgacgatga ctccctcgcc agcggacaag ctgttattgt 480  
gcaaatcctc gcagatagat gccgtttgca accccggaaa atcacgtcga agatcggcgg 540  
25 ccagtgcctt ggcacgatga tgtaccagga caaacggccc tgctcgcagc aactgggtca 600  
agctctgtcg tggtaatcgc tcaccctcgg gaagcaggct caacaggggt aaacgtcggc 660  
ccaccaagcg atgatgcct cggcggcga cactgtcata gcgcacgccc tctcccgcca 720  
30 gtgcactgac caccttctgc gccacatagc gggcccgtgt cgctgcaag ccgatccagt 780  
gaatcagacg gcctataggg cgggaagccg tattgaatcg gaaaagcaga tccgtgttgc 840  
35 gcaaggctgc cgccgcaata ggcctacgct cggcctcgta actctccaga agatccatcg 900  
gcaatgtggc ctgtatcaca cccgccagct tccaggcgag gttcgccgcg tcaccgatcc 960  
ccatctgcaa accttgcccc ccggcgggga cgtgggtgtg agcagcatct cccagcagaa 1020  
40 atacctccc ctggcgataa tgagtgcga ggcgtgctg gctgcggtaa cgagcgtcc 1080

45  
50  
55  
60  
65

ES 2 329 358 T3

acagcacctg cgccaatccg aaatcgggtc ccagaatata tttcatccct ccggcaattt 1140  
 cctcgtgggt gaccggctgt ttgaccggag tatccatacg ttcgttgtct tcgatactga 1200  
 5 cgcgataact gccatcgggt aatggaaaca gggcaaccag acccctggag accgaccttg 1260  
 catggactgc aggtgaaggc ggattttctca agacaacgtc cgccaccacc aacgaatgct 1320  
 10 tgtagtctctg cccgacaaac gaaatattga ggagttggcg gacagaactg ttgaccccat 1380  
 cagccccag caccagtcg tagcggcttt gctgcaegct gccggctctg ctgtgttcca 1440  
 gggttacctc aacgtgtaaa tcgccggcat ccagagcctt tagcgcatac ccacgettca 1500  
 15 gattcacccc cttgcgattg acccaatcag tcaacaccga ctcggctctga gactgtggga 1560  
 tgatcaccat gtggggatac tcacaagggg gtttgaaaa tgagagcgtt cggccccct 1620  
 20 tgtcacccaa cggcgcgctt gccagacga tccccgacg tatcatctca tctgccacgc 1680  
 cccaggcatt gagcaactcc agggtcacgg gctccaagcc aaaggcccgg gaatggggag 1740  
 aggcagccgg tcttttatcg atgagatcaa ccgctatacc caactcggcc agagctgcag 1800  
 25 ccacagccaa cccgacgggc cccgccccca cgaccaggac ctgtttattt ttaacgacca 1860  
 tgatcaccca cctctccaca gcagggggcg aacgtggcga caatgacgtg ctggtcggtg 1920  
 30 acgctcgttt ccattgctctg cagcccggcc gtttgcgca gctggattac ctcatgctct 1980  
 gatcgataat ctgccagtga gccagcagc cagttgatca atgtggtaa tccccagccc 2040  
 gcaggcaggt tctccaccag gcagaaaagg ccctgaggct tgagcacgcg acggacctca 2100  
 35 ttcaggetga cagactgtc agcccaatgg ccgaacgaca tcgagcacac caccagatcc 2160  
 atgctttgcg aggggaatgg caaggcttcg gcaactcctt tgacgaacga ggccaagggg 2220  
 40 cgtcgtttgg cggcctcgtc gaccatgcc tgagccgggt cgacgccttc gaagcgcgcc 2280  
 tcaggccaca gagcgaacat gcgttcgatc aatgcccggg taccacaacc gatgtccaga 2340  
 45 acacgctccg gtctcgaggt gcacatccat cggctcaaca ttcgcagaca gtcgtcatgg 2400  
 gcctggctca gtttgggtacc gtacttctct tcatacgtc ggcgcgatac gctgaacgtc 2460  
 cgcacaaaac ctggatttcc attgccttcc ccgccagaaa atacgtaga cattattgaa 2520  
 50 catccatata tcaacagtta tccgccaagg accatagtag agaaaatcca tcccatccaa 2580  
 ataaaaatta aataagtggg gctaaccgca atccagggaa actctgaaaa ggcccgtac 2640  
 55 ttgtcagcgc ggetgtctgg aggccgata gttactgaac ttactattaa aagactgggc 2700  
 tttttcagag cccaccgga tgttggctcc ttgtccatca tttcgggggc actgtaacat 2760  
 60 tctgttacct ggctatcgtt tgacttttaa tctgaacggg caattatagg tctaaccgca 2820

65

ES 2 329 358 T3

acagcccccac ggcgcttaag ttcgaaaaaa gtagctgcac cttgctcaac tgcattctgt 2880  
 aataagggggc actttacaag ccgcataaga cataaatttt atgctgactc cccaaacaag 2940  
 5 cagcacaagt aaaaaacact tgtccaatac caaggagggg atacgggtgca agcttcttta 3000  
 cgtcaaaaag ttctctgctt acagcagtct atcgatccca gccagccagg catgttactt 3060  
 10 gaagtgcgctt ttcattgtgat caccatctt tctacttcgc agttgggtatc gcgtatcgag 3120  
 agagtggctg agcgacatgc gtctttacgg cagcgctttg tcatgcgcaa tggcacttac 3180  
 15 tggattgaac aagccccacc gcaacaacga cgctactgcy tggtagcac ctatgatgaa 3240  
 gcatcgaccg atgcactgct ggcgccgagc cgcgagcaca tcgggggtga gtctgagcgt 3300  
 ttgttccgcy ccgaagtcgt tgagcgcagc gaoggacaac gctacttggg cttccgaatt 3360  
 20 catcacatca tcgcccacct gtggctctgtc ggcctcctga ttcgagactt tgccgaagac 3420  
 tgtatggacc gctccagcat caccctggcg tcaagaccga ttgccccgtt gatcgaccct 3480  
 25 gagttctggc ggcaccaaact gtcacaggac actccgtttt ccttgcccat ggcctccctg 3540  
 gaacagcaca cggaccgccg catggtgctg tcttcgctcg ttattgatca ggagagcagc 3600  
 gctgacctgg cccgcctggc cacagcctgc gcggtaacce cgtacaccgt aatgctcgcc 3660  
 30 gcacaagtat tggcgtctgc cagaatcggc cagagtggcc gtctgtcact tgcggtgacg 3720  
 ttccatggcc gcaacagggg caacaaggat gcggtaggtt acttcgcaa tacgcttgcc 3780  
 35 gtgcctttcg atgtcagcga atgcagcgtg ggcgagtttg tcaaacgcac cgccaagcgc 3840  
 ctggatgagg cctcaaaaagc cagcgtcggg gccggttatc ccgaattgga agagttcatg 3900  
 acgcccctgg gatgggctgc gaccgccccg accaatgcgg tgatttacca gcaggatatg 3960  
 40 ccaggcatgc caagaggatt ggcggcggct ctgctgggat tgggcacggg gcagttgggc 4020  
 gagatggcgc tgaccgcgga acaggcaccg cccagcatcg gcccgtttgc cactgcgctg 4080  
 45 ctgctgacgc gccacgacgg caagctgcat ggcgggtcgc aggtcgatcc tgcgcagcat 4140  
 cccggttggc tggcagaggg gttagccaga cagttcgtcg tgatcctgcy ggaaatgggtg 4200  
 cgtgatccac aggccagact gtcagccttg ccagcgtgcc tgttacacca accaaaatac 4260  
 50 ccgagccaag cgcggccggc gcctgcgtca gaaacattgg tagccacctt tctccggcaa 4320  
 gtcgccatca cgcgggacaa gcccgctgcy cgtacgccgc aggccagcat cagctatagc 4380  
 55 gaattggcca gtcgagtcgc caggctctcg gcagccttgc gcgtacgcgg cttcaaacct 4440  
 gaacagacc tggcaatact cctgcctcgc gatatcaatc tggtagccgc tctgctggcg 4500

60

65

ES 2 329 358 T3

atcatggcct gcggtggcag ttatgtgcca ctcaagtacg cgaacccccg cgaactcaac 4560  
 5 cgttcgattc tgaccagggc ccgttgccgc gcgattctca cggatcagga gggtttgacc 4620  
 cgtttcgctc acttggcgcc ctgctgggcc ttgagcgacc tgctgtcgat gcccgacgcc 4680  
 ccgctgcagg accagtccaa gcttcaagcc aaggcctata tcctatttac cagcggctcc 4740  
 10 accggtgaac caaaaggcgt ggcgatcacc catgctaag cgcaccaact gctgcggtgg 4800  
 gcgctctcgc attgtggccc cgagtacctg gcgcaaacac tggcggaac cccactacg 4860  
 15 ttgatcttt cgattttcca gatgtttgct ccccttatgg tcggtggctg cgtacagccc 4920  
 gtttcctcgg tcatggcgct gatcgacaat ccggccctgc taaagggcac aacctgatc 4980  
 aatacgggtg cgtcggtgcc cgacgctttg ttgcagcatg atgtactggt gccttccttg 5040  
 20 cgcgatgctc acctcgcggg agaaccctg aaccgggac tttacctgcg gcttcaggca 5100  
 aaactgaccg ccacacgcat cgtcaacctc tacggcccca cggaaacaac aacctattcc 5160  
 25 accgccctgg tgatcgagcc cgcacaaca gagatcacca tcggttttcc actgtatggc 5220  
 acctgggtgg atgtcgttga tcaaaacatg caaagcgtcg gtatcgggtg acctggcgag 5280  
 ttgatcattc atggacacgg cgtggcgcaa ggctatgtca gcgacccccg gcgtagcgcc 5340  
 30 gcttctttcc tgccggcatc cgatggcttg cgttgctacc gcacgggaga ccgtgtccgc 5400  
 tggttgcccc atggccgcct ggactttatc ggtcgagagg atgatcaggt caaagttcgc 5460  
 35 ggtttcgggg tcgagttggg gcctgttcag gcggcactgc atgccattga gacgattcat 5520  
 gaatccgcag tagtcgttgt gccgaaaggg cagcagcgca gcacgtggc gttcatcgtc 5580  
 ctcaaagcgc cgagcgaaga tgaagcggtg cagcgcata acatcaaaca aacttactc 5640  
 40 ggcgtactcc cctattacgc actaccggac aagtttattt ttgttaaagc actgccaaaga 5700  
 aacacacatg gaaaaatcga cagaacgctg ctcttgcaac atgagcccca gactgagcaa 5760  
 45 gaaagcgcca tgcgagatgc gaccgacgtc gaacatcgca tcgccaaactg ctggcaaacc 5820  
 atcatcggac acccgtcca actccacgaa aacttctctg acattggcgg ccactcgctt 5880  
 50 tcgcttacgc atttaacggg cctactgaga aaagaattta atattcatat ttctctacac 5940  
 gacctctgga tcaggccaac catagaaca caggccgact tcattcataa gttgcaaaat 6000  
 tcggtattga caaacctgc cgccgcgcca atcccgcgac ttgaccgaaa gatctctcat 6060  
 55 cattaatcag gagtaccgca tgagcgtcga tacatgcagg actgcaactt tccctgcgtc 6120  
 atacggccag gaacagatct ggtttctgaa cgaactaac ccgcactctc aactggetta 6180  
 60 taccctggcg atgaaagtat ctatcgccgg gaaattgaac aactgcgggt tgcagcgtgc 6240

65

ES 2 329 358 T3

5 ggtcaaccaa gtggtggcct cccaggaaat tttgagaaca tcattcgccct ataaaaacca 6300  
 gaagttgagc caggtcattt caccctccgc gacactgccc attcgcagcg cgcactgcat 6360  
 10 tgacgatgta cctgggctgc aacgcctgat caacatggaa gcccgagcgtg gctggtcgct 6420  
 gagcagcgcg ccaactgtacc gcttgetgct gataaaaacc ggcgaccagc aacatgagct 6480  
 ggtcatctgc acccaccata tcgtctgcga tggcatctcg ctgcaactgc tgctgcaaaa 6540  
 aatagtcagc gcctatcaag gccaaagcga tggcggggtg ctcaacaagtc cggatgaaga 6600  
 15 gaccctgcaa ttcgtcgatt atgcgccctg gtcaaggcag cacgaatatg ccggtctcga 6660  
 gtactggcgc cagcaactgg ccgacgcccc gacaatcctg gatatttcga caaaaaccgg 6720  
 ccgaagtgag caacagacat ttctcggcgc gcgaattccc gtcgagttca gccaccacca 6780  
 20 atggcaagca ttgcccaga tattcagacc ccagggtatc tcctgcgagg cgggtgttctt 6840  
 ggcggcctac tgcgtcgtcc tgcaccgcct ggccgagcag gacgacattc tgatcgggct 6900  
 gccaaactca aatcgctgc gtccggagtt ggcacagggtg atcggctacc tgtccaatct 6960  
 25 gtgcggtgtt cgcagccagt atgctcacga ccagagcgtc acagacttcc ttcaacaggt 7020  
 tcaattgacc ttaccecaact tgatcgagca cggggagacg cctttccagc aagtactgga 7080  
 aagtgtgag catacccggc aagccggtgt gacgccgttg tgccaagtac tgtttggtta 7140  
 30 tgagcaggac gttcgacgca cgctggatat cggcgacctg caattgacgg tctcggatgt 7200  
 ggacacgggg gccgcacgcc tggatctatc gctgttcttg ttcgaggacc acgaaactca 7260  
 35 cgtttgcggt tttctggaat atgccacgga ccgtatcgac gccgcattct cgcaaaacat 7320  
 ggtgcgcatg ctcagcagcg tgctacgca gttcgttgcg gcgcccagc cgccgctcag 7380  
 cgaagtacag ctggggcgcg cggattccca agcccagaca cctgcgatcg caccagcatt 7440  
 40 cccaagcgtg ccggctcgtc tgttcgcctt ggacagcagt caccccaatg cgaccgcgct 7500  
 gcgtgacgag caaggtgaac tgacctatgc gcaagtttg caacagattc tgcaggcagc 7560  
 45 ggccactctg cgagcccagg gggcgaaaacc tggaaacctg atcgcgggtca tcggcgagcg 7620  
 cggtaacccc tggttgatcg ccattgtggc gatctggcaa gtcggcggtg tctatgtgcc 7680  
 attgtccaag gacctgcccg aacagcgctt gcaaggcatc ctggcggaac tcgaaggggc 7740  
 50 catactgatt accgacgaca ccacgccgga acgcttccgg caacgtgtga cgctgcccatt 7800  
 gcacgcctta tgggcccgatg gcgcaacgca tcacgagcgg cagacgacgg acgccagccg 7860  
 55 gctgtctggc tacatgatgt acacctcggg atcgaccggt aaaccgaaag gcgtgcatgt 7920

60

65

ES 2 329 358 T3

cagccaggcc aacctggtcg cgaccctgag cgcattcggc cagctgctgc aggtgaaacc 7980  
 5 cagcgatcgg atgctcgcac tgacgaacct ctccttcgac atttcgctgc tcgagctgct 8040  
 gcttccccctg gtccagggcg ccagcgtgca aatcgtctgc gcacaggctc aacgcgatgc 8100  
 ggaaaagctc gcgggctatc tcgcagacct tcggatcacg cttgttcagg ccacaccggt 8160  
 10 gacctggaga ctattactgt cgacaggctg gcagccacgg gaaagcctga ccctgctgtg 8220  
 cgggtggcgaa gcgctgccac aggatctggc ggacagggtg tgcttgccgg gcattgacctt 8280  
 15 gtggaacctc tacggcccca ccgaaacaac aatctggctc acggcctgcc gcctgcaacc 8340  
 ggggtgcgccc gtgcaactgg gccatcccat tgcaggtagc caaatagccc tgggtggatcg 8400  
 gaacctgcgc agcgtgccca gaggggttat cggatgaactg ctgatttgcg gccccggcgt 8460  
 20 cagccaggggc tactatcgca acccggttga aacagccaag cggttcgtac cggaccgcga 8520  
 tggttcaggt aagcgcgcct atctgaccgg cgaccggatg cgcattgcagc aggatggttc 8580  
 25 gctggcctat atcggccgac gtgacgacca gatcaagctg cgcggccacc gtatcgagct 8640  
 gggagagatc gagacagcgt tgcgaaaact gcccggcgta cgggatgctg ccgcccact 8700  
 ccatgaccag gacccaagtc gaggcataca ggcccttgtc cagctttgcg caacggctga 8760  
 30 tgagagcctc atcgatatag gccagtggtt ggaaacactg cgccaaacgc tgcctgaggc 8820  
 gtggctgcct actgagtatt acaggatcga tggcatccct cttacctaca acggcaaacg 8880  
 35 cgacaggaag cgcctcctgc accaggcctg caggctgcaa aactcagtc tgagggtggc 8940  
 tcccagcagt gacaccgaga cccgggtgca gcagatctgg tgcgagctgc tcggtctcga 9000  
 ggatatcggc gttacggatg attttttcca gttaggcggc cactccattc tgggtggcggc 9060  
 40 catggtcgag cgcategaaa ccgcgtttgg acggcgcgta cctatcgag atatctattt 9120  
 ttctccgacg atcgcccgtg tggcggcgac gctggactcc atgacatttg aacaaggact 9180  
 45 ggccgcacac agcgtgaaag gcgattggga gttcaccgcc atcagccttc aacacaacgc 9240  
 cgacagcaca gccgcccctc aggagagatg aatcatgcac agccccacta tcgatacttt 9300  
 cgaggccgca ctgcctcat tgcccgtgct ccgcgacgca cttgggtgctt atcccttgct 9360  
 50 cagcgaacaa aagcgcctct gggtactggc ccaactggcg ggcacggcaa cgttgccggt 9420  
 aacggtgcgt tatgcattca ccggcacggt ggaccttgct gtcgtgcagc agaacctgag 9480  
 55 cgcgtggatc gcacacagcg agtccttacg cagccttttc gtcgaagtac tggaaacgccc 9540  
 cgtcaggctt ctgatgccta cgggcctggt gaaactggag tacttcgac gccccgcatc 9600  
 60 cgatgccgat atggccgagc tcataggcgc cgcctttgaa ctcgacaaaag ggcggttgct 9660

65

ES 2 329 358 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

gcgtgcgttc atcactegaa ccgctgcaca acagcatgaa ttgcatctgg tcggccatcc 9720  
 tattgtcgtg gacgaacctt ccctgcagcg cattgccc aaacctctcc agaccgaacc 9780  
 cgatcatcag taccocgceg teggtgcgat cgccgaggta ttccagcgcg aacagacact 9840  
 ggcacaggat gcgcaaatca ccgaacaatg gcagcaatgg ggaataggcc ttcaggcgcc 9900  
 tgcggcaacc gaaattccga ccgaaaaccc ccgccccgct atcaagggct cagatcgtca 9960  
 agtacatgaa gcccttactg catggggcga ccaaccgta gcagaggccg aaattgtcag 10020  
 cagttggctg accgtgctga tgcgctggca gggatcgcaa tcggcgcttt gcgcaatcaa 10080  
 ggtgcgcgac aaggcgcgat ccaacttgat cgcccactg caaacctacc tgccgggtccg 10140  
 cgttgatatg ccggatggca gcaccctggc acaactgca ctccagggtg aggaacagct 10200  
 caatggcaac gaccatccgt ccttttccac gctgctggaa gtttgcccac caaagcggga 10260  
 cctgagtcgc accccctact tccaaaccgg cctgcagttc attgcgacg atgttgaaca 10320  
 gcgcgacttc catgcggca acttgacacg cctgccaacg aagcagccaa gcagcgacct 10380  
 tgacctgttc atttctgct gggtaagcga cggcacgctt ggctgacgc tggattatga 10440  
 ttgcgccgtg ctgaattcga gccaggtcga ggttctggcc caggcgctca tcagcgtatt 10500  
 gtcagcgcgc ggtgaacagc caatcgcaac cgttgcgctg atgggccagc aaatgcagca 10560  
 aaccgtcctg gctcaggccc accggccccc caccagcgcg ccgcaactga cactgaccga 10620  
 atgggtcgc gccagcacgg aaaaatccc gctggcggtt gcggtgatcg accacggcca 10680  
 gcagctcagc tatgcagagt tatgggcaag agctgcactg gtagcggcga acatcagcca 10740  
 gcattgtggca aagcctcga gcatcatcgc ttagcactg cccagatcgg ctgaatttat 10800  
 tgcagcgcgt ctgggggtag tgcgagcagg tcatgcgttc ttgccatcg atccccgct 10860  
 gccaccgac cgcattccagt tcctgattga aaacagtggc tgtgagttgg tcattacctc 10920  
 tgatcagcaa tccgtggagg gttggccgca ggtcgccagg atacgaatgg aggcgcttga 10980  
 tccagacatt cgctgggtgg cgccgacggg gctcagccac agcgatgcg cctacctgat 11040  
 ctatacctcc ggcagcaccg gcgttccgaa gggagtcggt gtcgagcacc ggcaagtagt 11100  
 gaataacatc ttgtggcggc aacgaacctg gccgctgacg gcacaggaca acgtgctgca 11160  
 taaccattcg ttcagcttcg atcccagcgt ctgggcgctt ttctggccgc tgetgaccgg 11220  
 tggcaccata gtgctggcgg atgtcagaac catggaggac agcaccgccc tcctcgacct 11280  
 gatgatccgc catgatgtca gcgttctggg tggcgtaccg agccttctcg gtacgctgat 11340

60  
65

ES 2 329 358 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

cgatcatcca ttcgccaatg attgcccggc ggtcaagctg gtgctcagtg gcggcgaagt 11400  
 cctcaacccc gaactggcac acaaaattca aaaggtctgg caggccgacg tcgccaacct 11460  
 ctatggccct accgaagcga ccatcgatgc gctgtatfff tcgatcgaca aaaatgctgc 11520  
 cggcgcctac ccgattggct atccaatcga caataccgac gcttatatcg tcgacctcaa 11580  
 tctcaaccca gtcccggcag gcgttccggg agaaatcatg cttgctggcc agaaccttgc 11640  
 gcgcggctat ttgggcaaac ctgcgcaaac cgcgcagcgc ttcctgccc aacctttgg 11700  
 caacggacgc gtgtatgcaa cgggcatct gggacgacgc tggcatcgg gggccatcag 11760  
 ctacctgggc cgacgcgacc aacaggtgaa gattcgcggg catcgcattg agcttaacga 11820  
 agtcgctcat ctggttgcc aggcgcttga gctgaaggaa gccatcgtct tcgcccagca 11880  
 cgctggaacc gaacaggcac gcctggtggc ggccatcgag caacagccag gcctgcacag 11940  
 tgaaggtatc aaacaggaat tgctgcgcca cttgccagcc tatctgatcc ctageccagct 12000  
 cctgctattg gatgaactgc caagaaccgc caccggcaag gtcgacatgc tcaagcttga 12060  
 tcagttggca gcccctcagc tcaatgacgc cgggggcacg gaatgccgtg cgccacgtac 12120  
 cgaccttga caatcggta tgacggattt cgcccagta ctcggcctca ctgcggtaac 12180  
 gccggacacg gatttcttcg agcaaggcgg caactcgatt ctactcacgc gcctggcagg 12240  
 caccttgtct gccaaatacc aggtgcagat tccactgcat gagtttttcc tgactccgac 12300  
 cccggcagcg gtggcgcagg caattgaaat ctaccgtcgc gaaggcctca cggcactcct 12360  
 gtcacgccag catgcacaaa cgctggagca ggacatctac ctggaagaac acattcggcc 12420  
 ggatggctta ccacatgcca actggtacca gccttctgtc gtgtttctga cgggagccac 12480  
 cggctacctg ggactgtacc tgatcgaaca gttgetcaag cgcaccacca gccgcgtcat 12540  
 ctgcctgtgc cgtgcaaagg atgccgagca tgccaaggcc aggattctgg aaggcctgaa 12600  
 aacctaccgc atcgacgtag gcagcgaact gyaccgggtg gagtacctca cgggacacct 12660  
 ggcgttgccg cacctgggcc tgagcgagca tcaatggcaa acgctggccg aagaggtcga 12720  
 tgtgatttat cacaacggcg ccttggtaaa ctttgtctac ccctacagcg cactcaaggc 12780  
 gaccaacgtg ggaggcacgc aggccattct ggaattggcc tgcaccgctc gactcaagag 12840  
 tgttcagtat gtctccaccg tggatacgtt cctggcgacg catgtcccc gcccttttat 12900  
 cgaggacgat gccccctgc gttccgccgt cggcgtacca gtgggctaca caggcagcaa 12960  
 gtgggtggca gaaggggtgg ccaatcttgg cctgcgctgc ggcattccgg tcagcatctt 13020  
 ccgcccgggc ttgatcctgg gccataccga aacgggtgcc tcgcagagca tcgactacct 13080

ES 2 329 358 T3

gctgggtagc ctacgggggt tcttgcccat gggcatcgtg ccggattacc cacgcatctt 13140  
 5 cgacatcgtg cccgtggact aygtcgccgc ggcgatcgtg cacatatcga tgcaaccgca 13200  
 gggcagggac aaattcttcc acctgttcaa cccggcgccg gtcaccatcc gccagttctg 13260  
 cgactggatt cgcgaattcg gttacgagtt caagttggtc gacttcgaac acggtcggca 13320  
 10 gcaggcattg agcgtaccgc ccgggcacct gctgtaccgc ttgggtcccc tgatcagggg 13380  
 tgccgatccg ctgccccacc gcgcgctgga ccctgactac atccatgaag tgaaccccg 13440  
 15 actggaatgc aagcaaacct tagagctgct ggctcctcg gacatcacc tgtcgaaaac 13500  
 cacaaaggct tacgcgaca caattttgcg ctacctgata gacaccggct tcatggccaa 13560  
 gcctggcgtg tagcggattg agcacaaca ggacgaatat catggaatcg atagcctttc 13620  
 20 ccattgcaca taagcccttc atcctgggct gtccgaaaa cctgccggcc accgagcggg 13680  
 cgcttgcccc ttctgcgccg atggcgccgc aggttttggg gtacctcga gcggtcccc 13740  
 25 aggcgaaaaa cctcgagcag tacctcggga cgctcgtga agtcctggcg cacctgcctt 13800  
 gtgcttccac cggactgatg accgatgatc cacgggaaaa ccaggaaaac cgcgacaacg 13860  
 atttcgcctt cggattttaa cgacaccagg gcgacactgt gacctgatg gtcaaggcca 13920  
 30 cccttgatgc agcgattcaa acgggcgagt tggccaacg cagcggcact agcctggatc 13980  
 actcggagtg gagcgacatg atgtcagtcg cacaggtgat tctgcagacg attgccgacc 14040  
 35 ctcgggttat gcccgaaatc cgtttgacgt tccaggcacc gaaaagcaag gtcgaagaag 14100  
 atgaccagga cccgctgcga cgctgggtgc gtggccacct gctgttcatg gtcctgtgcc 14160  
 aaggcatgag cctgtgtacc aaacctcga tcagcgccgc ccacgacaag gacctcgaac 14220  
 40 tggcgtgtgc acaggccaat cgctgattc aactgatgaa catctcgcgc atcacgcttg 14280  
 agtttgcaac cgacctgaac tcacaacagt acgtcagcca gattcgcctg acgctcatgc 14340  
 45 cgscgatcgc gccgcccagg atgagtggca tcaactggcg tgaccatgtg gtgatgattc 14400  
 gttggatgag ccagtcacc gatgctgga acttcattga gcaggcctac cctcaactgg 14460  
 ctgaacgtat gcgaaccaca ttggcgagg tctacagcgc tcatcggggg gtctcgaaa 14520  
 50 agttcgtagg cgaagaaaac accagtttgt tggccaagga aaacgccact aatacggccg 14580  
 gccaggtggt ggaaaacctg aagaaatcga gattgaata cctcaagaca aaaggttgcg 14640  
 55 ccggtgcggg ataagccctg actgcgcctc gccccatca aaaccggact gatattcggg 14700  
 aaaacaaagg agagaagcat gccgacattt ctgggagacg acgacgcagt gccatgcgtg 14760  
 60  
 65

ES 2 329 358 T3

gtcgctggtta acgccgacaa acactatttcg atttggccaa gcgcgagaga cattccatca 14820  
 5 ggttgggtccg aagaaggatt caaggggtca cgttcagact gcttggaca tatcgcgcaa 14880  
 atctggccag agccgacggc atagatacaa cgtgatgcaa aaaatgcggg aaacatcaac 14940  
 taaccaaagc aaggaagaaa aatgacttca actcatcgca ccactgatca agtcaagcct 15000  
 10 gctgttcttg atatgccagg cctgtcgggc attcttttcg gccacggcg attccaatac 15060  
 ctgccccca gctgcgaatt ggatctgttc gagcatgtcc gcgacctgcg cgaagccacc 15120  
 aaggagagca tcagcagccg actgaagttg caggaacgcg ccgccgatat tctgctgctg 15180  
 15 ggcgcgacct ccctgggcat gctgggtcaag gaaaacggca tctaccgcaa tgccgatgtg 15240  
 gttgaggatt tgatggccac ggacgactgg caacgtttca aggataccgt ggcctttgaa 15300  
 20 aactatatcg tctatgaagg gcagctggac tttaccgagt ccctgcagaa aaacactaac 15360  
 gtcggccttc agcgtttccc gggcgaaggg cgggacctct atcaccgctt gcaccagaat 15420  
 cctaagctgg aaaacgtgtt ctaccgctac atgcgctcgt ggtctgaact ggccaaccag 15480  
 25 gacctggtca agcacctcga cctgtcgcgc gtgaaaaaat tgctcgacgc ggggtggcgg 15540  
 gatgcggtca acgccatcgc cctggccaaa cacaatgagc aactgaacgt aacggtagctg 15600  
 30 gatatcgaca actccattcc ggtcactcag ggcaaatca atgattccgg gctcagccac 15660  
 cgggtgaaag cccaggcatt ggatatcctg caccaatcct tcctgaagg ttacgactgc 15720  
 attctcttcg cccaccaatt ggtgatatgg accctcgaag aaaacacca catgctgcgc 15780  
 35 aaggcctacg atgcgctacc agaaggcggg cgcgtggtca tcttcaactc catgtccaac 15840  
 gatgaaggcg acggccccgt catggccgca ctggacagcg tctactttgc ctgtctaccc 15900  
 40 gccgagggcg gcatgatcta ttccctggaaa cagtatgagg tctgcctggc ggaagccggc 15960  
 ttcaaaaacc ccgtacgcac cgcgattcca ggctggacct cacacggcat catcgtggcc 16020  
 tacaagtaat tttgcctcct ccgcccctac tggggccgga ggagtcattt caacatttgc 16080  
 45 gtcattgacg ccacctggcg atagggacac ccacatggca cgttcacccg agacaaatag 16140  
 tgcgatgccg caacagataa gacagctttt atacagccaa ctgatttcgc aatcgattca 16200  
 50 aaccttctgt gaactgcgcc tgctgatgt tctgcaagca gctggccagc ctacctecat 16260  
 cgaacggctt gctgagcaga cacacactca tatcagcgcc ctgtcacgct tgttgaaagc 16320  
 55 gttgaaacca ttcgggctag tgaagaaac cgacgaagg ttttccttga ccgatctcgg 16380  
 cgccagtctg acccagcagc cctttgcttc cgtcaaccc agtgctttgt tgatcaatgg 16440  
 60 tgaaatgggc caagcctggc gtggcatggc gcagacaatc cgaaccgggtg aatccagctt 16500

65

ES 2 329 358 T3

caagatgtac tatggcatca gcctgttcga gtatTTTgaa cagcaccCGg aacgcccggc 16560  
 5 cattTTTgac cgttcccaag acatgggact ggacctggag atcccggaaa tcctggagaa 16620  
 catcaacctg aatgacggtg agaacattgt cgatgtaggg ggtggttcag ggcatttgct 16680  
 gatgcacatg ctggacaagt ggcagaaaag cacaggcata cttttcgact taccctgcgc 16740  
 10 ggcaaaaatc gcgcagcaac atctgcacaa atctggaaaa gcaggctgct ttgaaatcgt 16800  
 cgcaggggat tttttcaaga gcctgccgga cagtggcagc gtttacttgc tgtcccatgt 16860  
 cttgcacgac tggggcgacg aagactgcaa ggccattttg gccacctgcc ggcggagcat 16920  
 15 gccggacaat gcgctggttg ttgtagtggg cttggtgatt gaccagagtg aaagtgccca 16980  
 gcccaacccc acgggcgcaa tgatggatct ttacatgctg tccttgttcg gtatcgccgg 17040  
 20 aggcaaagag cgcaacgagg atgaattcag aacctcatt gaaaacagcg gcttcaacgt 17100  
 caaacaggtg aagcgcctgc caagtggaaa cggcatcatc ttcgcctacc caaaataaat 17160  
 gatcctcatt gccctcgcc actttccagg ggggctattt tattctcggg tgattcccc 17220  
 25 cctaattgatt acaaggaaga cacatgtcga cgctggttta ctacgtagca gcaacctgg 17280  
 atggttatat cgccactcaa caacacaaac tggattggct ggagaacttt gccctggggg 17340  
 30 atgacgcaac ggctatgay gatttttacc agacgatcgg agcagtggtc atgggatcgc 17400  
 agacctatga atggatcatg tcgaacgctc ccgatgactg gccctaccag gacgtacctg 17460  
 cctttgtcat gagcaaccgg gatctgtcag cccccgcaa tttggatata accttcttac 17520  
 35 gcggcgatgc cagtgccatc gcggtcaggg ccaggcaagc ggcgaagggc aagaatgtct 17580  
 ggetggtcgg tggcggcaaa acggcggcct gttttgcaa cgcaggggaa ttacagcagc 17640  
 40 tgttcatcac cactattcca acctttatcg gcaccggcgt tccggtagtg cccgtagacc 17700  
 gcgcgcttga agtggttctc agagaacaac gcacgctgca gagcgggtgc atggaatgca 17760  
 tcctggacgt gaaaaaagcg gattaacgtc tacaagaaa tcgtgtatcg aaactcgcaa 17820  
 45 cgtccaaacc caagggaaaa accagtgaag cgattggtat tgagtatatg tttgttggt 17880  
 gttatcgctc tcgccagtgt tcaaggaata aggatggtga aaccgccgc cctgacagcc 17940  
 50 gccgatgctc gcgatatcgg ctatctgaat gtacgcgata gcctttccgt cattgccgcc 18000  
 gccccacc ccaccgctc acctcgccag gccgttgtca ggcattattt gcgggaaacg 18060  
 attgcccga tgggttacca ggtggtgag caacctttc tatttaccat cgagagcatg 18120  
 55 gtgaaccggc agaaaaccct ctatgccgag ttgaacgagc agcagcgcca agcgttcgat 18180

60

65

ES 2 329 358 T3

5 gctgagctgg cccgggtggg cgcgacagt tttgaaaaag aagtgcggat tcgctccggc 18240  
 ctactggaag gcgacagegg ccagggaaacc aacttgatag cctcacaccg cgtaccggga 18300  
 gcgaccgcga cggtcctggt catggcgcat tacgacagcg tcggcacccg tcccgggtgcc 18360  
 10 agtgacgatg gcatggccgt cgcctcgata ctccaactga tgcgggaaac cataaccggc 18420  
 agcgatgcca aaaataacgt tgtctttcta ctcrcgatg gcgaagaact gggcttgctc 18480  
 ggagcggagc actacgtctc gcagctcagt acgcctgaac gtgaagccat ccgcctgggtg 18540  
 15 ttgaactttg aagcccgggg taaccagggc atccctttac tgttsgagac atcccagaag 18600  
 gactacgccc tgatcaggac tgttaacgca ggggttcggg acatcatatc ettctcatc 18660  
 acgcccttga tttacaatat gctacaaaac gacaccgact ttacggtggt caggaaaaag 18720  
 20 aacatgcggg ggttgaattt tgcagtcgtg gagggttttc agcactacca ccacatgags 18780  
 gacaccgtgg agaaccttgs gccagagacc ttgtttcgct accaaaagac agtgcgtgaa 18840  
 25 gtgggcaacc actttateca gggtatcgac ctctcctccc tgagtgtga tgaggacgca 18900  
 acctatttcc cactgccagg cggcacgctg ttggtactca acttaccac cctgtatgcg 18960  
 ctgggcatgg gctcgttcgt gctctgcggt ctttggggcg aacgctgccg cactcgcga 19020  
 30 cagcatcagg gcaagaattg cgtactgcgc cccatggcta ttgccctgct cggcattgcc 19080  
 tgcgcagcac ttgtatteta cgtcccagac attgcctatc tattcgtcat ccccagtctg 19140  
 35 cttctggctt gcgcatggt gtcgcgaagc ctctttatct cctattcgat catgctgctg 19200  
 ggcgcttatg cctgcgggat actctacgcy cctatcgtct acctgatttc atcaggectt 19260  
 40 aaaatgccgt tcattgccgg ggtcattgca ctactcccgc tetgcctgct ggccgtggga 19320  
 ctggccggcg tcatcgcacg atcgagagac tgtcgaacct gcgactagca agacccgata 19380  
 aaacgtcgct tcaaacgcca gatgacgtgc ctcgtcagcc aggcgtggaa ccatctggtg 19440  
 45 gcggcaaatg tgcataaggt gggaaacgcag agcgcccgct gcaacacgcc caccccaagc 19500  
 accgcgcctc aacggataat caggctcaag ggaattccac cttgcaacct gaaagagcaa 19560  
 50 tcgagcggcc gtcggacaca acaaactgat caccgtcaat tcgggcaagg agcaatccac 19620  
 gggcttttgc tccaacctca actccccttg aaaaatcagc cggccacaat ttgccctac 19680  
 cctttcagga tatectgat aagcgtttta tcagaacagc gaaaaaccac ttcaagttcg 19740  
 55 tgtacttttt actgcatctt gcgatcgctc ccatggtaca araatgacag atgggaagat 19800  
 cgctttaata cctactctct cacctgagaa aaagtaacca ccgggccgta ttctgatca 19860  
 60 gacactatcg cctgcacaca aaatttcttc tctggaaact tactcagcaa caccatcctc 19920

65

ES 2 329 358 T3

catgactgag caataagggt gcacagttgt tcataaacag cttcatcgac tctatcgctg 19980  
 cagcctgcaa aaacatcata cagggtgcaca tgattcaaaa ccttctcaac cgccaccaca 20040  
 5 tcacgattac aagactgcat ccaactggag aatgcttcaa cagtaaatcc gctttccaga 20100  
 aacacgcccc actcgtaaac aacaaagtct ggaaacaaca cggtggaaaa caccaggaca 20160  
 10 tcttcaggat gtacaacatc actaataaaa caagactcaa ccaactcggg ttgatccttc 20220  
 cattgggact tccagcgtc gtatttggga gacctgacag ggtctgtcgt cctgattatt 20280  
 ttcatagcac tgttcctgca ctgatgcctt ttggcgattt tttgtttgag cgagaatcga 20340  
 15 tcgatggctc attgttcac aagaaaaaaaa ttctctcga acagactctt aagctcggcc 20400  
 cggcgcgttg agaacagtga aaagtcactc gccacatcct gaatattctc tgtgacctc 20460  
 20 acaagatacc cagtattcag cttttcaatg ggaaagcctg acgcagcaat ccgctcaaca 20520  
 tcgacctctt cagcaaacctc atcgccgtag aacatagccc aaccgatatt gggcacgtcc 20580  
 ggtttcaaag ccgaattgaa tgagccgatc tgaaaacttt tatatttctc atgcgggcta 20640  
 25 agttcgggtt cactgaacag gtgcagcatt ccgagttgag gaggaaaaat ttcacaccat 20700  
 gccttgaaga gcgaatacca atcgacgtc ttgctactga ccgagcggta tgtgattgcy 20760  
 ccaggaacca cctgcccccg gacattgcgc gccgtgtgga tgacgtccc acagccttta 20820  
 accgcctttt ttctgcgcca ggcaaagtcc aggtagaagt ccgataatgc gccgttaaac 20880  
 cgtatggccg cctttgatgc ccagcacgct tcactcggcg ccacgccccat gaaaggctct 20940  
 35 ccgaatttat ccgcattgtg cgacacctgc totggaacca gtaactccc tccccgactt 21000  
 aatgacgaaa tgaacgctc tccaacaccc caaccgatag tttcagactt cgtcctgatt 21060  
 gtaatttgca catagggtt cataaatcgt caaagtctcg tcaattcacg ggtgacacaa 21120  
 40 gtatatccaa agagctctc cacgttactc atcgcatcga gtctatcaac caaccaacgc 21180  
 cgectcacgc gccaccgccc acggcgccat caaccgctgc ggggtctgyc aggttttgcy 21240  
 cttgagcacg aaattgoggc atttctcggc gaattggtgg cggttgtgca ccatgtccaa 21300  
 ctgcatctgc gccagctcgg cttcacggca gcggtgaatc tggtcgatgt ccaacgccc 21360  
 tttacgggcy cgagccacgg cgtacttttc atcgggtaac gcgctgctg cctgctgcat 21420  
 50 cagccaacgy ctgaaggcgt gcgggcagcy cgggccgatg ccctgaacca gcccgtattg 21480  
 ctcggcttgc aaggcactga tcggcaggca ggcgtcggty agttgatggg cgacttcact 21540  
 55 gccaacggy cytggcaggc tgtaggcca gtattcggag ccgtacagc ccatggttt 21600

60

65

ES 2 329 358 T3

gtaatgcggg ttgagtacca cgcttctcgcg ggccaatacg atgtctgcgg ccagcgcag 21660  
 cattaacacca ccggcgcccg cgctgcccgt caggccgctg atcaccagtt gccgggcccgt 21720  
 5 gagcagttcg tggcacacat cgtacgatgg cctgaatgtt ggcccaggct tccagccccg 21780  
 gcactggggc ggccctggatg acgcttgaggt gcacaccatt ggaaaagctg ccgcgcccgc 21840  
 10 ccttgatcac cagcacttgg gtgtcccgcg tcttggecca gcgcaacgcc gccaccagtc 21900  
 gctggcactg ctccggtgctc atggcgcccgt tgtagaactc aaagggtgagt tcaccgacat 21960  
 ggccggcttc gcgatagcga atccggtgat aggcttgctc atcgaacatt tgattggcga 22030  
 15 tcgagctgctc cagcacggga atatccgccca gtgcttccgc cagcacgtgg cgggcccggca 22080  
 gcttgaagggt ctctccccc ggccgggctt tgcgtttgag cgagccgatc cacaggctct 22140  
 20 gatcaccggc cgccaccagc accgcgtcgt cctgcaccgc gaggatctca cccggtgtgc 22200  
 cgtggcgcgc atccaggtgc gcgtcgtaca ggttaactc cccgccctgg atactggcca 22260  
 gcacaccggg ctggccatcg getgcgtcga tgcagcgtt gatgaagcgt gcgcaatcgt 22320  
 25 accaactgaa ggtgcgatca gcctgtgtca tgttcggctg caaacgcccg attacgtggg 22380  
 cttgggtgta atcgagcggc accgggacga aaacccggc gaacttttcc accacgtcgc 22440  
 30 ggatgcaata gagggcggcg tcactcaccg cgccgttgta cagctcggat ttgcgcacat 22500  
 cggcaggcat gtcgaattca caggtcgacc agatcgccc ggctccatt tcctccaccg 22560  
 cctgcaaagc cgtgacgcc cagcggccga cctgctggct gatggcccag tccagcgcgc 22620  
 35 tggcaccacg gtcgcccagc atgcccggat ggataatcac cacagggcgc tcaaggttgc 22680  
 tccaaagttg ctgtggcaca cggctcttca gaaaggggca gatcaccagg tggcgtctg 22740  
 40 aatectcgat ctgctggcac accaaggctg gatcggtgaa cagaacaacg ctgggcccgt 22800  
 gccccgactg gcgtaaatcc agccaggccc gctgggtcaa accggtgaac gccgacgcta 22860  
 acacgatgat cttcaatgac cgcattggctg actcatcctt gagaatgcgc ggccagaggt 22920  
 45 gctccttgag cctccctgg cctttgatgg aagtacaagg atagttggcg tgccaggcag 22980  
 gctacctgat caggatcaat cttgtgtcag cgagtgcttg aacgtaggcg cctgcgttca 23040  
 50 accaataggc gcatggactg gcgagtgtc ccgcgtgcc tctgccaca gggacgccag 23100  
 gtattcgcca aacccgccc gacacttgta gtcccagcgc gcactggtga ccacgggatt 23160  
 ggtcgcctc cacacgatcc ggcgcacaat cctctcgagg tcggccacca actgcacatc 23220  
 55 ttcattgggca accaaatgct ggaaccacc cgcgtttcga taggcatccg cactcaagcc 23280  
 caggttggca ccgtgtatat ggccggtggtt ctccggtgac tgatacaact caaggtagcg 23340

60

65

ES 2 329 358 T3

cgaacgaacc gattcacctg actcgctcca gctgtccacc tcgacgggtc cgcacacegc 23400  
 atcggcgcca aagccgatct gacgcaccag ccagtcgrcg ggcacaactg tgtcagcgtc 23460  
 5 ggtgaatgcc agccactggg cgccgacttc aagcaatcgc tccgcgcca aggccctggc 23520  
 cttgccaca tttegaacgc tcacctcaag cgtkgcgaca cccatggcgc acacgcgcgt 23580  
 10 ggcggtctcg tccgaacacg catccagcac caccagcaat tggacctggt ggtgtgccag 23640  
 agccggatga gcaatggcgc gctggatgga ggcgaggcag gcaactgatgt gccgttcttc 23700  
 gttatgggca ggtatcacta tccctatcat tgacgttccc tctaccagge aaagtgtcta 23760  
 15 cagctatcga ccgggcccgtg aggcagaagg tttaaacaat ctgaaggcgc cgccaaacaa 23820  
 tgacgtgaga caggtcgcag tgattaaacg gaacgtcaca ggcgcccacag gctcagatgg 23880  
 20 tttacgtggt tgatgcacgg atgaaccgc cattcctaca aacaggtcag ccatcatgtc 23940  
 taacgattat caaggtatcg ccagtgatcat cacggcttct cgtcacatgg gtacagactc 24000  
 ggatgaacgc cttaatgaga cggtaaatat tcaattgacc tgcagcggta aaccaacgat 24060  
 25 tgcgcggttg agtttcgaca ccccgcttca atggcccggc caccccaact ttgtgctgat 24120  
 caacctgccg gacggttcat cgggtgggtgg tgtgattgac gaaattgaaa agtcgaccga 24180  
 30 tggcccgggt tgggtgacgt ttacggtgga tgactgaggt cttcccaaca ggcttcaaat 24240  
 cacctccagg cggctgcctc gaatgagaca cacaggccag taatcgagac gcacagacaa 24300  
 gcctatcttc gcagatacat tttgtaacgt cctatgattg acgcttgetc gaatcacegc 24360  
 35 agggattggg tggcgtgtgt ttatcacgcc cttgaatccg cagcgaaaaa tgattcgagt 24420  
 tcagcgaaca attcgattgg gacaaacaaa aggatgcggg ctatgtcatt gcgtaattta 24480  
 40 tctttattgg tcaccacact ggcgctgttt aagtggggtg taatgcgctc gcggggcaaa 24540  
 acccaacatg ctcagtgatg atgacgtgaa atcccaaagc gccggcgcac tgggctatgc 24600  
 cccgacagac ctgagcatcg tcaaccgtcg aaccgaaggc accaacacct acgtgctgct 24660  
 45 taaaaccaac gacaacaagc agttcaactg cattatcaac ggaggcaata tcttgacctt 24720  
 cggatgtcc aaccgcctt cgtgtgcgaa gaaagggtgaa cagatcaaga gtggcccgtt 24780  
 50 cgggagctga tctgtcgtg gaaaaaaggg ccaggccacc tctaagaacg gaggcctggc 24840  
 ccttttttat tcgctcagat gagtttaaaa gacaagatat cgggcagctg ggctccggcc 24900  
 cgttcagtct gggcacccca cacaaaatgc tcagcgacta cttggccgtc gccgcacacc 24960  
 55 gtttaacggg tgcgacctac agcgtcrccc tggttgaagg cagcaacgaa taaacctat 25020

60

65

ES 2 329 358 T3

5      **tgatcggaga gcgaccatgc acccgcataa aaccgcgatt gtcttgattg aataccagaa 25080**  
       **cgacttcacc acccccggcg gcgtgtcca tgacgctgtg aaagacgtca tgcaaacgtc 25140**  
       **caacatgctg gcgaataccg ccaccacgat tgagcaggcc cgcaagctgg gcgtgaagat 25200**  
       **catccactta cccatccgct ttgccgacgg ctaccagag ctgaccctgc gctcatacgg 25260**  
 10     **cattctcaa ggcgtcgccg acggcagcgc gtttcgtgcc ggcagctggg gcgccgagat 25320**  
       **caccgacgcg ctgaaacgcg accccaccga tattgtgatc gaaggcaaac gcggcctgga 25380**  
       **tgctttcgcc accaccgggc tggacctggt gctgocgaac aatggcatcc agaacctggt 25440**  
       **tgtcgcaggt ttcctgacta actgctgctg tgaaggcacg gttcgatccg gttacgagaa 25500**  
       **aggttatgac gtggtgacct tgaccgactg caccgcgaca ttcagtgatg aacaacagcg 25560**  
 20     **cgcagccgag cagtttacgt tgccgatggt ttcgcaaac cctgcaacac accgcgtttc 25620**  
       **tgcaagcact gaacgccgga taaaaaagc ggcggactcc tgccgagtcg ccgctttttt 25680**  
       **agtgcttggg tcattcgggt ggcgctact gcatttcgcc gttcccaaac gaccagtctt 25740**  
       **cgcgcttcac gtccaccagg ctgatccaca cgtcttcctt gcgcagcccg gtcttggcat 25800**  
       **ggatgccgtc ggcgatgaac ttatagaaag ctttttcac gtcaatgctg cgeccggcgt 25860**  
 30     **tccacgtgac ttggataaac acgatcttgg gtgtgtaagt gacgccaaga taccggcccg 25920**  
       **ccgggtaaac cagctcatcc ttggcatggc ggttgatgat ctggaatttg tcgtgctcag 25980**  
       **gcacgctggc ccacactggt catcgccggc tacacgacat caccgatggc cgtcgcggtt 26040**  
       **tcagtggaag tgcggcggc gaggtcgatt cgaactaaag gcatggacaa atccttagtg 26100**  
       **atcttcagct gaaaatgggc gtgtggctca cacactcgcg ccaaccgggc aacttgccgc 26160**  
 40     **aggccaacga gttgctggcc cagggagttg ccgacggttt gcgctagtgc gccgcgaaac 26220**  
       **ttcggcattt gacgcatcgg tgaatggctg accggatgtc agtcttatt gacctgaata 26280**  
       **tagactgccg tgcacagacc aatcaaacia ataccggcga tgtagtaage ggcgcccatc 26340**  
       **tgactgtatt gaagcaatag agtaacgacc atcggcgtca ggccaccgaa tacggcgtac 26400**  
       **gacaagttgt aggaaaatga caagccggaa aaccgcacta ccggtggaaa ggcacgcacc 26460**  
 50     **atcacagcag gggctgcgcc tatcgccgcg acaaaaaaac cggtaatga atagagtgga 26520**  
       **accagccatt gcgggtgctt ttcaagcgtc ttgaacaaga gcagtgcgct gaacagaagc 26580**  
       **atgacgctgc cgatcatcaa taccarccc gactgaaat gatcgccag ttccccggcg 26640**  
       **atcacgcaac caacactcaa rrcacrcaat agcgagactg ttggcctgca aggcttgcgc 26700**  
       **tcgag 26705**

60

<210> SEQ ID 2  
 65 <211> Longitud: 1004  
 <212> Tipo: PRT

ES 2 329 358 T3

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA 2

5

Met Leu Leu Glu Val Ala Phe His Val Ile Thr His Leu Ser Thr Ser  
1 5 10 15

10

Gln Leu Val Ser Arg Ile Glu Arg Val Val Glu Arg His Ala Ser Leu  
20 25 30

15

Arg Gln Arg Phe Val Met Arg Asn Gly Thr Tyr Trp Ile Glu Gln Ala  
35 40 45

20

Pro Pro Gln Gln Arg Arg Tyr Cys Val Val Arg Thr Tyr Asp Glu Ala  
50 55 60

25

Ser Thr Asp Ala Leu Leu Ala Pro Ser Arg Glu His Ile Gly Val Glu  
65 70 75 80

30

Ser Glu Arg Leu Phe Arg Ala Glu Val Val Glu Arg Ser Asp Gly Gln  
85 90 95

35

Arg Tyr Leu Val Phe Arg Ile His His Ile Ile Ala Asp Leu Trp Ser  
100 105 110

40

Val Gly Leu Leu Ile Arg Asp Phe Ala Glu Asp Cys Met Asp Arg Ser  
115 120 125

45

Ser Ile Thr Leu Ala Ser Arg Pro Ile Ala Pro Leu Ile Asp Pro Glu  
130 135 140

50

Phe Trp Arg His Gln Met Ser Gln Asp Thr Pro Phe Ser Leu Pro Met  
145 150 155 160

55

Ala Ser Leu Glu Gln His Thr Asp Arg Arg Met Val Leu Ser Ser Phe  
165 170 175

60

Val Ile Asp Gln Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ala Arg Leu Ala Thr Ala  
180 185 190

65

ES 2 329 358 T3

Cys Ala Val Thr Pro Tyr Thr Val Met Leu Ala Ala Gln Val Leu Ala  
 195 200 205

5

Leu Ser Arg Ile Gly Gln Ser Gly Arg Leu Ser Leu Ala Val Thr Phe  
 210 215 220

10

His Gly Arg Asn Arg Gly Asn Lys Asp Ala Val Gly Tyr Phe Ala Asn  
 225 230 235 240

15

Thr Leu Ala Val Pro Phe Asp Val Ser Glu Cys Ser Val Gly Glu Phe  
 245 250 255

20

Val Lys Arg Thr Ala Lys Arg Leu Asp Glu Ala Ser Lys Ala Ser Val  
 260 265 270

25

Gly Ala Gly Tyr Pro Glu Leu Ala Glu Phe Met Thr Pro Leu Gly Trp  
 275 280 285

30

Ala Ala Thr Ala Pro Thr Asn Ala Val Ile Tyr Gln Gln Asp Met Pro  
 290 295 300

35

Gly Met Pro Arg Gly Leu Ala Ala Ala Leu Leu Gly Leu Gly Thr Val  
 305 310 315 320

40

Gln Leu Gly Glu Met Ala Leu Thr Ala Glu Gln Ala Pro Pro Ser Ile  
 325 330 335

45

Gly Pro Phe Ala Thr Ala Leu Leu Leu Thr Arg His Asp Gly Lys Leu  
 340 345 350

50

His Gly Arg Val Glu Val Asp Pro Ala Gln His Pro Gly Trp Leu Ala  
 355 360 365

55

Glu Ala Leu Ala Arg Gln Phe Ala Val Ile Leu Arg Glu Met Val Arg  
 370 375 380

60

Asp Pro Gln Ala Arg Leu Ser Ala Leu Pro Ala Cys Leu Leu His Gln  
 385 390 395 400

65

Pro Lys Tyr Pro Ser Gln Ala Arg Pro Ala Pro Ala Ser Glu Thr Leu  
 405 410 415

ES 2 329 358 T3

Val Ala Thr Phe Leu Arg Gln Val Ala Ile Thr Pro Asp Lys Pro Ala  
 420 425 430

5

Leu Arg Thr Pro Gln Ala Ser Ile Ser Tyr Ser Glu Leu Ala Ser Arg  
 435 440 445

10

Val Ala Arg Leu Ser Ala Ala Leu Arg Val Arg Gly Phe Lys Pro Glu  
 450 455 460

15

Gln Thr Leu Ala Ile Leu Leu Pro Arg Asp Ile Asn Leu Val Pro Ala  
 465 470 475 480

20

Leu Leu Ala Ile Met Ala Cys Gly Gly Ser Tyr Val Pro Leu Ser Asp  
 485 490 495

25

Ala Asn Pro Ala Glu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Thr Arg Ala Arg Cys  
 500 505 510

30

Arg Ala Ile Leu Thr Asp Gln Glu Gly Leu Thr Arg Phe Ala His Leu  
 515 520 525

35

Ala Pro Cys Trp Ser Leu Ser Asp Leu Leu Ser Met Pro Asp Ala Pro  
 530 535 540

40

Leu Gln Asp Gln Ser Lys Leu Gln Ala Lys Ala Tyr Ile Leu Phe Thr  
 545 550 555 560

45

Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Val Ala Ile Thr His Ala Asn  
 565 570 575

50

Ala Ala Asn Leu Leu Arg Trp Ala Ala Leu Asp Cys Gly Pro Glu Tyr  
 580 585 590

55

Leu Ala Gln Thr Leu Ala Ala Thr Pro Thr Thr Phe Asp Leu Ser Ile  
 595 600 605

60

Phe Glu Met Phe Ala Pro Leu Met Val Gly Gly Cys Val Gln Pro Val  
 610 615 620

65

Ser Ser Val Met Ala Leu Ile Asp Asn Pro Ala Leu Leu Lys Gly Thr  
 625 630 635 640

ES 2 329 358 T3

Thr Leu Ile Asn Thr Val Pro Ser Val Ala Asp Ala Leu Leu Gln His  
 645 650 655  
 5  
 Asp Val Leu Val Pro Ser Leu Arg Met Leu Asn Leu Ala Gly Glu Pro  
 660 665 670  
 10  
 Leu Asn Arg Asp Leu Tyr Leu Arg Leu Gln Ala Lys Leu Thr Ala Thr  
 675 680 685  
 15  
 Arg Ile Val Asn Leu Tyr Gly Pro Thr Glu Thr Thr Thr Tyr Ser Thr  
 690 695 700  
 20  
 Ala Leu Val Ile Glu Pro Ala Gln Gln Glu Ile Thr Ile Gly Phe Pro  
 705 710 715 720  
 25  
 Leu Tyr Gly Thr Trp Val Asp Val Val Asp Gln Asn Met Gln Ser Val  
 725 730 735  
 30  
 Gly Ile Gly Val Pro Gly Glu Leu Ile Ile His Gly His Gly Val Ala  
 740 745 750  
 35  
 Gln Gly Tyr Val Ser Asp Pro Val Arg Ser Ala Ala Ser Phe Leu Pro  
 755 760 765  
 40  
 Ala Ser Asp Gly Leu Arg Cys Tyr Arg Thr Gly Asp Arg Val Arg Trp  
 770 775 780  
 45  
 Leu Pro Asp Gly Arg Leu Asp Phe Ile Gly Arg Glu Asp Asp Gln Val  
 785 790 795 800  
 50  
 Lys Val Arg Gly Phe Arg Val Glu Leu Gly Pro Val Gln Ala Ala Leu  
 805 810 815  
 55  
 His Ala Ile Glu Thr Ile His Glu Ser Ala Val Val Val Val Pro Lys  
 820 825 830  
 60  
 Gly Gln Gln Arg Ser Ile Val Ala Phe Ile Val Leu Lys Ala Pro Ser  
 835 840 845  
 65  
 Glu Asp Glu Ala Val Gln Arg Asn Asn Ile Lys Gln His Leu Leu Gly  
 850 855 860  
 Val Leu Pro Tyr Tyr Ala Leu Pro Asp Lys Phe Ile Phe Val Lys Ala



ES 2 329 358 T3

Leu Arg Thr Ser Phe Ala Tyr Lys Asn Gln Lys Leu Ser Gln Val Ile  
 65 70 75 80

5

Ser Pro Ser Ala Thr Leu Pro Ile Arg Ser Ala His Cys Ile Asp Asp  
 85 90 95

10

Val Pro Gly Leu Gln Arg Leu Ile Asn Met Glu Ala Gln Arg Gly Trp  
 100 105 110

15

Ser Leu Ser Ser Ala Pro Leu Tyr Arg Leu Leu Leu Ile Lys Thr Gly  
 115 120 125

20

Asp Gln Gln His Glu Leu Val Ile Cys Thr His His Ile Val Cys Asp  
 130 135 140

25

Gly Ile Ser Leu Gln Leu Leu Leu Gln Lys Ile Val Ser Ala Tyr Gln  
 145 150 155 160

30

Gly Gln Ser Asp Gly Arg Val Leu Thr Ser Pro Asp Glu Glu Thr Leu  
 165 170 175

35

Gln Phe Val Asp Tyr Ala Ala Trp Ser Arg Gln His Glu Tyr Ala Gly  
 180 185 190

40

Leu Glu Tyr Trp Arg Gln Gln Leu Ala Asp Ala Pro Thr Ile Leu Asp  
 195 200 205

45

Ile Ser Thr Lys Thr Gly Arg Ser Glu Gln Gln Thr Phe Leu Gly Ala  
 210 215 220

50

Arg Ile Pro Val Glu Phe Ser His His Gln Trp Gln Ala Leu Arg Gln  
 225 230 235 240

55

Ile Phe Arg Pro Gln Gly Ile Ser Cys Ala Ala Val Phe Leu Ala Ala  
 245 250 255

60

Tyr Cys Val Val Leu His Arg Leu Ala Glu Gln Asp Asp Ile Leu Ile  
 260 265 270

65

Gly Leu Pro Thr Ser Asn Arg Leu Arg Pro Glu Leu Ala Gln Val Ile  
 275 280 285

ES 2 329 358 T3

5  
 Gly Tyr Leu Ser Asn Leu Cys Val Phe Arg Ser Gln Tyr Ala His Asp  
 290 295 300

10  
 Gln Ser Val Thr Asp Phe Leu Gln Gln Val Gln Leu Thr Leu Pro Asn  
 305 310 315 320

15  
 Leu Ile Glu His Gly Glu Thr Pro Phe Gln Gln Val Leu Glu Ser Val  
 325 330 335

20  
 Glu His Thr Arg Gln Ala Gly Val Thr Pro Leu Cys Gln Val Leu Phe  
 340 345 350

25  
 Gly Tyr Glu Gln Asp Val Arg Arg Thr Leu Asp Ile Gly Asp Leu Gln  
 355 360 365

30  
 Leu Thr Val Ser Asp Val Asp Thr Gly Ala Ala Arg Leu Asp Leu Ser  
 370 375 380

35  
 Leu Phe Leu Phe Glu Asp Glu Leu Asn Val Cys Gly Phe Leu Glu Tyr  
 385 390 395 400

40  
 Ala Thr Asp Arg Ile Asp Ala Ala Ser Ala Gln Asn Met Val Arg Met  
 405 410 415

45  
 Leu Ser Ser Val Leu Arg Glu Phe Val Ala Ala Pro Gln Ala Pro Leu  
 420 425 430

50  
 Ser Glu Val Gln Leu Gly Ala Ala Asp Ser Gln Ala Gln Thr Pro Ala  
 435 440 445

55  
 Ile Ala Pro Ala Phe Pro Ser Val Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Ala  
 450 455 460

60  
 Asp Ser His Pro Asn Ala Thr Ala Leu Arg Asp Glu Gln Gly Glu Leu  
 465 470 475 480

65  
 Thr Tyr Ala Gln Val Cys Gln Gln Ile Leu Gln Ala Ala Ala Thr Leu  
 485 490 495

Arg Ala Gln Gly Ala Lys Pro Gly Thr Leu Ile Ala Val Ile Gly Glu  
 500 505 510

Arg Gly Asn Pro Trp Leu Ile Ala Met Leu Ala Ile Trp Gln Val Gly

ES 2 329 358 T3

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
|    | 515 |     | 520 |     | 525 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| 5  | Gly | Ile | Tyr | Val | Pro | Leu | Ser | Lys | Asp | Leu | Pro | Glu | Gln | Arg | Leu | Gln |  |  |  |
|    | 530 |     |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |  |
| 10 | Gly | Ile | Leu | Ala | Glu | Leu | Glu | Gly | Ala | Ile | Leu | Ile | Thr | Asp | Asp | Thr |  |  |  |
|    | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |  |
| 15 | Thr | Pro | Glu | Arg | Phe | Arg | Gln | Arg | Val | Thr | Leu | Pro | Met | His | Ala | Leu |  |  |  |
|    |     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |  |  |
| 20 | Trp | Ala | Asp | Gly | Ala | Thr | His | His | Glu | Arg | Gln | Thr | Thr | Asp | Ala | Ser |  |  |  |
|    |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |  |
| 25 | Arg | Leu | Ser | Gly | Tyr | Met | Met | Tyr | Thr | Ser | Gly | Ser | Thr | Gly | Lys | Pro |  |  |  |
|    |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |  |
| 30 | Lys | Gly | Val | His | Val | Ser | Gln | Ala | Asn | Leu | Val | Ala | Thr | Leu | Ser | Ala |  |  |  |
|    | 610 |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |  |
| 35 | Phe | Gly | Gln | Leu | Leu | Gln | Val | Lys | Pro | Ser | Asp | Arg | Met | Leu | Ala | Leu |  |  |  |
|    | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |  |
| 40 | Thr | Thr | Phe | Ser | Phe | Asp | Ile | Ser | Leu | Leu | Glu | Leu | Leu | Leu | Pro | Leu |  |  |  |
|    |     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |  |
| 45 | Val | Gln | Gly | Ala | Ser | Val | Gln | Ile | Ala | Val | Ala | Gln | Ala | Gln | Arg | Asp |  |  |  |
|    |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |  |
| 50 | Ala | Glu | Lys | Leu | Ala | Gly | Tyr | Leu | Ala | Asp | Pro | Arg | Ile | Thr | Leu | Val |  |  |  |
|    |     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |  |
| 55 | Gln | Ala | Thr | Pro | Val | Thr | Trp | Arg | Leu | Leu | Leu | Ser | Thr | Gly | Trp | Gln |  |  |  |
|    | 690 |     |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |  |
| 60 | Pro | Arg | Glu | Ser | Leu | Thr | Leu | Leu | Cys | Gly | Gly | Glu | Ala | Leu | Pro | Gln |  |  |  |
|    | 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |  |  |
| 65 | Asp | Leu | Ala | Asp | Arg | Leu | Cys | Leu | Pro | Gly | Met | Thr | Leu | Trp | Asn | Leu |  |  |  |
|    |     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |  |  |
| 70 | Tyr | Gly | Pro | Thr | Glu | Thr | Thr | Ile | Trp | Ser | Thr | Ala | Cys | Arg | Leu | Gln |  |  |  |
|    |     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |  |  |  |

ES 2 329 358 T3

5 Pro Gly Ala Pro Val Gln Leu Gly His Pro Ile Ala Gly Thr Gln Ile  
755 760 765

10 Ala Leu Val Asp Arg Asn Leu Arg Ser Val Pro Arg Gly Val Ile Gly  
770 775 780

15 Glu Leu Leu Ile Cys Gly Pro Gly Val Ser Gln Gly Tyr Tyr Arg Asn  
785 790 795 800

20 Pro Val Glu Thr Ala Lys Arg Phe Val Pro Asp Pro His Gly Ser Gly  
805 810 815

25 Lys Arg Ala Tyr Leu Thr Gly Asp Arg Met Arg Met Gln Gln Asp Gly  
820 825 830

30 Ser Leu Ala Tyr Ile Gly Arg Arg Asp Asp Gln Ile Lys Leu Arg Gly  
835 840 845

35 His Arg Ile Glu Leu Gly Glu Ile Glu Thr Ala Leu Arg Lys Leu Pro  
850 855 860

40 Gly Val Arg Asp Ala Ala Ala Gln Leu His Asp Gln Asp Pro Ser Arg  
865 870 875 880

45 Gly Ile Gln Ala Phe Val Gln Leu Cys Ala Thr Val Asp Glu Ser Leu  
885 890 895

50 Ile Asp Ile Gly Gln Trp Leu Glu Thr Leu Arg Gln Thr Leu Pro Glu  
900 905 910

55 Ala Trp Leu Pro Thr Glu Tyr Tyr Arg Ile Asp Gly Ile Pro Leu Thr  
915 920 925

60 Tyr Asn Gly Lys Arg Asp Arg Lys Arg Leu Leu His Gln Ala Val Arg  
930 935 940

65 Leu Gln Thr Leu Ser Leu Arg Val Ala Pro Ser Ser Asp Thr Glu Thr  
945 950 955 960

Arg Val Gln Gln Ile Trp Cys Glu Leu Leu Gly Leu Glu Asp Ile Gly  
965 970 975

ES 2 329 358 T3

Val Thr Asp Asp Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Ile Leu Val Ala  
 980 985 990

5

Arg Met Val Glu Arg Ile Glu Thr Ala Phe Gly Arg Arg Val Pro Ile  
 995 1000 1005

10

Ala Asp Ile Tyr Phe Ser Pro Thr Ile Ala Arg Val Ala Ala Thr  
 1010 1015 1020

15

Leu Asp Ser Met Thr Phe Glu Gln Gly Leu Ala Ala His Ser Val  
 1025 1030 1035

20

Lys Gly Asp Trp Glu Phe Thr Ala Ile Ser Leu Gln His Asn Ala  
 1040 1045 1050

25

Asp Ser Thr Ala Ala Ala Gln Glu Arg  
 1055 1060

30

<210> SEQ ID 4

<211> Longitud: 1432

<212> Tipo: PRT

35

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA 4

40

Met His Ser Pro Thr Ile Asp Thr Phe Glu Ala Ala Leu Arg Ser Leu  
 1 5 10 15

45

Pro Ala Ala Arg Asp Ala Leu Gly Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Glu Gln  
 20 25 30

50

Lys Arg Leu Trp Leu Leu Ala Gln Leu Ala Gly Thr Ala Thr Leu Pro  
 35 40 45

55

Val Thr Val Arg Tyr Ala Phe Thr Gly Thr Val Asp Leu Ala Val Val  
 50 55 60

60

Gln Gln Asn Leu Ser Ala Trp Ile Ala His Ser Glu Ser Leu Arg Ser  
 65 70 75 80

65

Leu Phe Val Glu Val Leu Glu Arg Pro Val Arg Leu Leu Met Pro Thr

ES 2 329 358 T3

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

ES 2 329 358 T3

5 Leu Glu Val Cys Pro Pro Lys Arg Asp Leu Ser Arg Thr Pro Tyr Phe  
325 330 335

10 Gln Thr Gly Leu Gln Phe Ile Ala His Asp Val Glu Gln Arg Asp Phe  
340 345 350

15 His Ala Gly Asn Leu Thr Arg Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ser Ser Asp  
355 360 365

20 Leu Asp Leu Phe Ile Ser Cys Trp Val Ser Asp Gly Thr Leu Gly Leu  
370 375 380

25 Thr Leu Asp Tyr Asp Cys Ala Val Leu Asn Ser Ser Gln Val Glu Val  
385 390 395 400

30 Leu Ala Gln Ala Leu Ile Ser Val Leu Ser Ala Pro Gly Glu Gln Pro  
405 410 415

35 Ile Ala Thr Val Ala Leu Met Gly Gln Gln Met Gln Gln Thr Val Leu  
420 425 430

40 Ala Gln Ala His Gly Pro Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Thr Leu Thr  
435 440 445

45 Glu Trp Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Ser Pro Leu Ala Val Ala Val  
450 455 460

50 Ile Asp His Gly Gln Gln Leu Ser Tyr Ala Glu Leu Trp Ala Arg Ala  
465 470 475 480

55 Ala Leu Val Ala Ala Asn Ile Ser Gln His Val Ala Lys Pro Arg Ser  
485 490 495

60 Ile Ile Ala Val Ala Leu Pro Arg Ser Ala Glu Phe Ile Ala Ala Leu  
500 505 510

65 Leu Gly Val Val Arg Ala Gly His Ala Phe Leu Pro Ile Asp Pro Arg  
515 520 525

Leu Pro Thr Asp Arg Ile Gln Phe Leu Ile Glu Asn Ser Gly Cys Glu  
530 535 540

ES 2 329 358 T3

5 Leu Val Ile Thr Ser Asp Gln Gln Ser Val Glu Gly Trp Pro Gln Val  
 545 550 555 560  
 Ala Arg Ile Arg Met Glu Ala Leu Asp Pro Asp Ile Arg Trp Val Ala  
 565 570 575  
 10 Pro Thr Gly Leu Ser His Ser Asp Ala Ala Tyr Leu Ile Tyr Thr Ser  
 580 585 590  
 15 Gly Ser Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Val Val Glu His Arg Gln Val  
 595 600 605  
 20 Val Asn Asn Ile Leu Trp Arg Gln Arg Thr Trp Pro Leu Thr Ala Gln  
 610 615 620  
 25 Asp Asn Val Leu His Asn His Ser Phe Ser Phe Asp Pro Ser Val Trp  
 625 630 635 640  
 30 Ala Leu Phe Trp Pro Leu Leu Thr Gly Gly Thr Ile Val Leu Ala Asp  
 645 650 655  
 35 Val Arg Thr Met Glu Asp Ser Thr Ala Leu Leu Asp Leu Met Ile Arg  
 660 665 670  
 40 His Asp Val Ser Val Leu Gly Gly Val Pro Ser Leu Leu Gly Thr Leu  
 675 680 685  
 45 Ile Asp His Pro Phe Ala Asn Asp Cys Arg Ala Val Lys Leu Val Leu  
 690 695 700  
 50 Ser Gly Gly Glu Val Leu Asn Pro Glu Leu Ala His Lys Ile Gln Lys  
 705 710 715 720  
 55 Val Trp Gln Ala Asp Val Ala Asn Leu Tyr Gly Pro Thr Glu Ala Thr  
 725 730 735  
 60 Ile Asp Ala Leu Tyr Phe Ser Ile Asp Lys Asn Ala Ala Gly Ala Ile  
 740 745 750  
 65 Pro Ile Gly Tyr Pro Ile Asp Asn Thr Asp Ala Tyr Ile Val Asp Leu  
 755 760 765

ES 2 329 358 T3

Asn Leu Asn Pro Val Pro Pro Gly Val Pro Gly Glu Ile Met Leu Ala  
 770 775 780  
 5  
 Gly Gln Asn Leu Ala Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Pro Ala Gln Thr Ala  
 785 790 795 800  
 10  
 Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Phe Gly Asn Gly Arg Val Tyr Ala Thr  
 805 810 815  
 15  
 Gly Asp Leu Gly Arg Arg Trp Ser Ser Gly Ala Ile Ser Tyr Leu Gly  
 820 825 830  
 20  
 Arg Arg Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Leu Asn  
 835 840 845  
 25  
 Glu Val Ala His Leu Leu Cys Gln Ala Leu Glu Leu Lys Glu Ala Ile  
 850 855 860  
 30  
 Val Phe Ala Gln His Ala Gly Thr Glu Gln Ala Arg Leu Val Ala Ala  
 865 870 875 880  
 35  
 Ile Glu Gln Gln Pro Gly Leu His Ser Glu Gly Ile Lys Gln Glu Leu  
 885 890 895  
 40  
 Leu Arg His Leu Pro Ala Tyr Leu Ile Pro Ser Gln Leu Leu Leu Leu  
 900 905 910  
 45  
 Asp Glu Leu Pro Arg Thr Ala Thr Gly Lys Val Asp Met Leu Lys Leu  
 915 920 925  
 50  
 Asp Gln Leu Ala Ala Pro Gln Leu Asn Asp Ala Gly Gly Thr Glu Cys  
 930 935 940  
 55  
 Arg Ala Pro Arg Thr Asp Leu Glu Gln Ser Val Met Thr Asp Phe Ala  
 945 950 955 960  
 60  
 Gln Val Leu Gly Leu Thr Ala Val Thr Pro Asp Thr Asp Phe Phe Glu  
 965 970 975  
 65  
 Gln Gly Gly Asn Ser Ile Leu Leu Thr Arg Leu Ala Gly Thr Leu Ser  
 980 985 990  
 Ala Lys Tyr Gln Val Gln Ile Pro Leu His Glu Phe Phe Leu Thr Pro

ES 2 329 358 T3

|    | 995             |                 | 1000            |                 | 1005                    |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| 5  | Thr Pro<br>1010 | Ala Ala Val     | Ala Gln<br>1015 | Ala Ile Glu Ile | Tyr Arg Arg Glu<br>1020 |
| 10 | Gly Leu<br>1025 | Thr Ala Leu Leu | Ser<br>1030     | Arg Gln His Ala | Gln Thr Leu Glu<br>1035 |
| 15 | Gln Asp<br>1040 | Ile Tyr Leu Glu | Glu<br>1045     | His Ile Arg Pro | Asp Gly Leu Pro<br>1050 |
| 20 | His Ala<br>1055 | Asn Trp Tyr Gln | Pro<br>1060     | Ser Val Val Phe | Leu Thr Gly Ala<br>1065 |
| 25 | Thr Gly<br>1070 | Tyr Leu Gly Leu | Tyr<br>1075     | Leu Ile Glu Gln | Leu Leu Lys Arg<br>1080 |
| 30 | Thr Thr<br>1085 | Ser Arg Val Ile | Cys<br>1090     | Leu Cys Arg Ala | Lys Asp Ala Glu<br>1095 |
| 35 | His Ala<br>1100 | Lys Ala Arg Ile | Leu<br>1105     | Glu Gly Leu Lys | Thr Tyr Arg Ile<br>1110 |
| 40 | Asp Val<br>1115 | Gly Ser Glu Leu | His<br>1120     | Arg Val Glu Tyr | Leu Thr Gly Asp<br>1125 |
| 45 | Leu Ala<br>1130 | Leu Pro His Leu | Gly<br>1135     | Leu Ser Glu His | Gln Trp Gln Thr<br>1140 |
| 50 | Leu Ala<br>1145 | Glu Glu Val Asp | Val<br>1150     | Ile Tyr His Asn | Gly Ala Leu Val<br>1155 |
| 55 | Asn Phe<br>1160 | Val Tyr Pro Tyr | Ser<br>1165     | Ala Leu Lys Ala | Thr Asn Val Gly<br>1170 |
| 60 | Gly Thr<br>1175 | Gln Ala Ile Leu | Glu<br>1180     | Leu Ala Cys Thr | Ala Arg Leu Lys<br>1185 |
| 65 | Ser Val<br>1190 | Gln Tyr Val Ser | Thr<br>1195     | Val Asp Thr Leu | Leu Ala Thr His<br>1200 |
| 70 | Val Pro<br>1205 | Arg Pro Phe Ile | Glu<br>1210     | Asp Asp Ala Pro | Leu Arg Ser Ala<br>1215 |

ES 2 329 358 T3

Val Gly Val Pro Val Gly Tyr Thr Gly Ser Lys Trp Val Ala Glu  
 1220 1225 1230  
 5 Gly Val Ala Asn Leu Gly Leu Arg Arg Gly Ile Pro Val Ser Ile  
 1235 1240 1245  
 10 Phe Arg Pro Gly Leu Ile Leu Gly His Thr Glu Thr Gly Ala Ser  
 1250 1255 1260  
 15 Gln Ser Ile Asp Tyr Leu Leu Val Ala Leu Arg Gly Phe Leu Pro  
 1265 1270  
 20 Met Gly Ile Val Pro Asp Tyr Pro Arg Ile Phe Asp Ile Val Pro  
 1280 1285 1290  
 25 Val Asp Tyr Val Ala Ala Ala Ile Val His Ile Ser Met Gln Pro  
 1295 1300 1305  
 30 Gln Gly Arg Asp Lys Phe Phe His Leu Phe Asn Pro Ala Pro Val  
 1310 1315 1320  
 35 Thr Ile Arg Gln Phe Cys Asp Trp Ile Arg Glu Phe Gly Tyr Glu  
 1325 1330 1335  
 40 Phe Lys Leu Val Asp Phe Glu His Gly Arg Gln Gln Ala Leu Ser  
 1340 1345 1350  
 45 Val Pro Pro Gly His Leu Leu Tyr Pro Leu Val Pro Leu Ile Arg  
 1355 1360 1365  
 50 Asp Ala Asp Pro Leu Pro His Arg Ala Leu Asp Pro Asp Tyr Ile  
 1370 1375 1380  
 55 His Glu Val Asn Pro Ala Leu Glu Cys Lys Gln Thr Leu Glu Leu  
 1385 1390 1395  
 60 Leu Ala Ser Ser Asp Ile Thr Leu Ser Lys Thr Thr Lys Ala Tyr  
 1400 1405 1410  
 65 Ala His Thr Ile Leu Arg Tyr Leu Ile Asp Thr Gly Phe Met Ala  
 1415 1420 1425  
 Lys Pro Gly Val  
 1430

ES 2 329 358 T3

<210> SEQ ID 5

<211> Longitud:350

<212> Tipo: PRT

5 <213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA 5

10

Met Glu Ser Ile Ala Phe Pro Ile Ala His Lys Pro Phe Ile Leu Gly  
1 5 10 15

15

Cys Pro Glu Asn Leu Pro Ala Thr Glu Arg Ala Leu Ala Pro Ser Ala  
20 25 30

20

Ala Met Ala Arg Gln Val Leu Glu Tyr Leu Glu Ala Cys Pro Gln Ala  
35 40 45

25

Lys Asn Leu Glu Gln Tyr Leu Gly Thr Leu Arg Glu Val Leu Ala His  
50 55 60

30

Leu Pro Cys<sup>3</sup> Ala Ser Thr Gly Leu Met Thr Asp Asp Pro Arg Glu Asn  
65 70 75 80

35

Gln Glu Asn Arg Asp Asn Asp Phe Ala Phe Gly Ile Glu Arg His Gln  
85 90 95

40

Gly Asp Thr Val Thr Leu Met Val Lys Ala Thr Leu Asp Ala Ala Ile  
100 105 110

45

Gln Thr Gly Glu Leu Val Gln Arg Ser Gly Thr Ser Leu Asp His Ser  
115 120 125

50

Glu Trp Ser Asp Met Met Ser Val Ala Gln Val Ile Leu Gln Thr Ile  
130 135 140

55

Ala Asp Pro Arg Val Met Pro Glu Ser Arg Leu Thr Phe Gln Ala Pro  
145 150 155 160

60

Lys Ser Lys Val Glu Glu Asp Asp Gln Asp Pro Leu Arg Arg Trp Val  
165 170 175

65

ES 2 329 358 T3

5 Arg Gly His Leu Leu Phe Met Val Leu Cys Gln Gly Met Ser Leu Cys  
 180 185 190  
 10 Thr Asn Leu Leu Ile Ser Ala Ala His Asp Lys Asp Leu Glu Leu Ala  
 195 200 205  
 15 Cys Ala Gln Ala Asn Arg Leu Ile Gln Leu Met Asn Ile Ser Arg Ile  
 210 215 220  
 20 Thr Leu Glu Phe Ala Thr Asp Leu Asn Ser Gln Gln Tyr Val Ser Gln  
 225 230 235 240  
 25 Ile Arg Pro Thr Leu Met Pro Ala Ile Ala Pro Pro Lys Met Ser Gly  
 245 250 255  
 30 Ile Asn Trp Arg Asp His Val Val Met Ile Arg Trp Met Arg Gln Ser  
 260 265 270  
 35 Thr Asp Ala Trp Asn Phe Ile Glu Gln Ala Tyr Pro Gln Leu Ala Glu  
 275 280 285  
 40 Arg Met Arg Thr Thr Leu Ala Gln Val Tyr Ser Ala His Arg Gly Val  
 290 295 300  
 45 Cys Glu Lys Phe Val Gly Glu Glu Asn Thr Ser Leu Leu Ala Lys Glu  
 305 310 315 320  
 50 Asn Ala Thr Asn Thr Ala Gly Gln Val Leu Glu Asn Leu Lys Lys Ser  
 325 330 335  
 55 Arg Leu Lys Tyr Leu Lys Thr Lys Gly Cys Ala Gly Ala Gly  
 340 345 350  
 60 <210> SEQ ID 6  
 <211> Longitud: 61  
 <212> Tipo: PRT  
 <213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2  
 65 <400> SECUENCIA: 6  
 Met Pro Thr Phe Leu Gly Asp Asp Asp Ala Val Pro Cys Val Val Val  
 1 5 10 15

ES 2 329 358 T3

Val Asn Ala Asp Lys His Tyr Ser Ile Trp Pro Ser Ala Arg Asp Ile  
 20 25 30

5

Pro Ser Gly Trp Ser Glu Glu Gly Phe Lys Gly Ser Arg Ser Asp Cys  
 35 40 45

10

Leu Glu His Ile Ala Gln Ile Trp Pro Glu Pro Thr Ala  
 50 55 60

15

<210> SEQ ID 7

<211> Longitud: 355

<212> Tipo: PRT

20

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA 7

25

Met Thr Ser Thr His Arg Thr Thr Asp Gln Val Lys Pro Ala Val Leu  
 1 5 10 15

30

Asp Met Pro Gly Leu Ser Gly Ile Leu Phe Gly His Ala Ala Phe Gln  
 20 25 30

35

Tyr Leu Arg Ala Ser Cys Glu Leu Asp Leu Phe Glu His Val Arg Asp  
 35 40 45

40

Leu Arg Glu Ala Thr Lys Glu Ser Ile Ser Ser Arg Leu Lys Leu Gln  
 50 55 60

45

Glu Arg Ala Ala Asp Ile Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ser Leu Gly Met  
 65 70 75 80

50

Leu Val Lys Glu Asn Gly Ile Tyr Arg Asn Ala Asp Val Val Glu Asp  
 85 90 95

55

Leu Met Ala Thr Asp Asp Trp Gln Arg Phe Lys Asp Thr Val Ala Phe  
 100 105 110

60

Glu Asn Tyr Ile Val Tyr Glu Gly Gln Leu Asp Phe Thr Glu Ser Leu  
 115 120 125

65

Gln Lys Asn Thr Asn Val Gly Leu Gln Arg Phe Pro Gly Glu Gly Arg  
 130 135 140

ES 2 329 358 T3

Asp Leu Tyr His Arg Leu His Gln Asn Pro Lys Leu Glu Asn Val Phe  
 145 150 155 160  
 5  
 Tyr Arg Tyr Met Arg Ser Trp Ser Glu Leu Ala Asn Gln Asp Leu Val  
 165 170 175  
 10  
 Lys His Leu Asp Leu Ser Arg Val Lys Lys Leu Leu Asp Ala Gly Gly  
 180 185 190  
 15  
 Gly Asp Ala Val Asn Ala Ile Ala Leu Ala Lys His Asn Glu Gln Leu  
 195 200 205  
 20  
 Asn Val Thr Val Leu Asp Ile Asp Asn Ser Ile Pro Val Thr Gln Gly  
 210 215 220  
 25  
 Lys Ile Asn Asp Ser Gly Leu Ser His Arg Val Lys Ala Gln Ala Leu  
 225 230 235 240  
 30  
 Asp Ile Leu His Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Asp Cys Ile Leu Phe  
 245 250 255  
 35  
 Ala His Gln Leu Val Ile Trp Thr Leu Glu Glu Asn Thr His Met Leu  
 260 265 270  
 40  
 Arg Lys Ala Tyr Asp Ala Leu Pro Glu Gly Gly Arg Val Val Ile Phe  
 275 280 285  
 45  
 Asn Ser Met Ser Asn Asp Glu Gly Asp Gly Pro Val Met Ala Ala Leu  
 290 295 300  
 50  
 Asp Ser Val Tyr Phe Ala Cys Leu Pro Ala Glu Gly Gly Met Ile Tyr  
 305 310 315 320  
 55  
 Ser Trp Lys Gln Tyr Glu Val Cys Leu Ala Glu Ala Gly Phe Lys Asn  
 325 330 335  
 60  
 Pro Val Arg Thr Ala Ile Pro Gly Trp Thr Pro His Gly Ile Ile Val  
 340 345 350  
 Ala Tyr Lys  
 355

65 <210> SEQ ID 8  
 <211> Longitud 347  
 <212> Tipo: PRT

ES 2 329 358 T3

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA 8

5

Met Ala Arg Ser Pro Glu Thr Asn Ser Ala Met Pro Gln Gln Ile Arg  
1 5 10 15

10

Gln Leu Leu Tyr Ser Gln Leu Ile Ser Gln Ser Ile Gln Thr Phe Cys  
20 25 30

15

Glu Leu Arg Leu Pro Asp Val Leu Gln Ala Ala Gly Gln Pro Thr Ser  
35 40 45

20

Ile Glu Arg Leu Ala Glu Gln Thr His Thr His Ile Ser Ala Leu Ser  
50 55 60

25

Arg Leu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Phe Gly Leu Val Lys Glu Thr Asp  
65 70 75 80

30

Glu Gly Phe Ser Leu Thr Asp Leu Gly Ala Ser Leu Thr His Asp Ala  
85 90 95

35

Phe Ala Ser Ala Gln Pro Ser Ala Leu Leu Ile Asn Gly Glu Met Gly  
100 105 110

40

Gln Ala Trp Arg Gly Met Ala Gln Thr Ile Arg Thr Gly Glu Ser Ser  
115 120 125

45

Phe Lys Met Tyr Tyr Gly Ile Ser Leu Phe Glu Tyr Phe Glu Gln His  
130 135 140

50

Pro Glu Arg Arg Ala Ile Phe Asp Arg Ser Gln Asp Met Gly Leu Asp  
145 150 155 160

55

Leu Glu Ile Pro Glu Ile Leu Glu Asn Ile Asn Leu Asn Asp Gly Glu  
165 170 175

60

Asn Ile Val Asp Val Gly Gly Gly Ser Gly His Leu Leu Met His Met  
180 185 190

65

ES 2 329 358 T3

Leu Asp Lys Trp Pro Glu Ser Thr Gly Ile Leu Phe Asp Leu Pro Val  
 195 200 205

5

Ala Ala Lys Ile Ala Gln Gln His Leu His Lys Ser Gly Lys Ala Gly  
 210 215 220

10

Cys Phe Glu Ile Val Ala Gly Asp Phe Phe Lys Ser Leu Pro Asp Ser  
 225 230 235 240

15

Gly Ser Val Tyr Leu Leu Ser His Val Leu His Asp Trp Gly Asp Glu  
 245 250 255

20

Asp Cys Lys Ala Ile Leu Ala Thr Cys Arg Arg Ser Met Pro Asp Asn  
 260 265 270

25

Ala Leu Leu Val Val Val Asp Leu Val Ile Asp Gln Ser Glu Ser Ala  
 275 280 285

30

Gln Pro Asn Pro Thr Gly Ala Met Met Asp Leu Tyr Met Leu Ser Leu  
 290 295 300

35

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

40

Leu Ile Glu Asn Ser Gly Phe Asn Val Lys Gln Val Lys Arg Leu Pro  
 325 330 335

45

Ser Gly Asn Gly Ile Ile Phe Ala Tyr Pro Lys  
 340 345

<210> SEQ ID 9

<211> Longitud: 180

50 <212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

55

<400> SECUENCIA: 9

Met Ser Thr Leu Val Tyr Tyr Val Ala Ala Thr Leu Asp Gly Tyr Ile  
 1 5 10 15

60

Ala Thr Gln Gln His Lys Leu Asp Trp Leu Glu Asn Phe Ala Leu Gly  
 20 25 30

65

ES 2 329 358 T3

Asp Asp Ala Thr Ala Tyr Asp Asp Phe Tyr Gln Thr Ile Gly Ala Val  
 35 40 45

5

Val Met Gly Ser Gln Thr Tyr Glu Trp Ile Met Ser Asn Ala Pro Asp  
 50 55 60

10

Asp Trp Pro Tyr Gln Asp Val Pro Ala Phe Val Met Ser Asn Arg Asp  
 65 70 75 80

15

Leu Ser Ala Pro Ala Asn Leu Asp Ile Thr Phe Leu Arg Gly Asp Ala  
 85 90 95

20

Ser Ala Ile Ala Val Arg Ala Arg Gln Ala Ala Lys Gly Lys Asn Val  
 100 105 110

25

Trp Leu Val Gly Gly Gly Lys Thr Ala Ala Cys Phe Ala Asn Ala Gly  
 115 120 125

30

Glu Leu Gln Gln Leu Phe Ile Thr Thr Ile Pro Thr Phe Ile Gly Thr  
 130 135 140

35

Gly Val Pro Val Leu Pro Val Asp Arg Ala Leu Glu Val Val Leu Arg  
 145 150 155 160

40

Glu Gln Arg Thr Leu Gln Ser Gly Ala Met Glu Cys Ile Leu Asp Val  
 165 170 175

Lys Lys Ala Asp  
 180

45

<210> SEQ ID 10

<211> Longitud: 220

50

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA: 10

55

Met Ser Asn Val Phe Ser Gly Gly Lys Gly Asn Gly Asn Pro Gly Phe  
 1 5 10 15

60

Val Arg Thr Phe Ser Arg Ile Ala Pro Thr Tyr Glu Glu Lys Tyr Gly  
 20 25 30

65

Thr Lys Leu Ser Gln Ala His Asp Asp Cys Leu Arg Met Leu Ser Arg



ES 2 329 358 T3

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

ES 2 329 358 T3

5  
 Glu Ile Ala Gly Gly Met Lys Asp Ile Leu Gly Thr Asp Phe Gly Leu  
 245 250 255  
 10  
 Ala Gln Val Leu Trp Ser Ala Arg Tyr Arg Ser Gln Gln Arg Leu Ala  
 260 265 270  
 15  
 Thr His Tyr Arg Gln Gly Arg Val Phe Leu Leu Gly Asp Ala Ala His  
 275 280 285  
 20  
 Thr His Val Pro Ala Gly Gly Gln Gly Leu Gln Met Gly Ile Gly Asp  
 290 295 300  
 25  
 Ala Ala Asn Leu Ala Trp Lys Leu Ala Gly Val Ile Gln Ala Thr Leu  
 305 310 315 320  
 30  
 Pro Met Asp Leu Leu Glu Ser Tyr Glu Ala Glu Arg Arg Pro Ile Ala  
 325 330 335  
 35  
 Ala Ala Ala Leu Arg Asn Thr Asp Leu Leu Phe Arg Phe Asn Thr Ala  
 340 345 350  
 40  
 Ser Gly Pro Ile Gly Arg Leu Ile His Trp Ile Gly Leu Gln Ala Thr  
 355 360 365  
 45  
 Arg Ala Pro Tyr Val Ala Gln Lys Val Val Ser Ala Leu Ala Gly Glu  
 370 375 380  
 50  
 Gly Val Arg Tyr Asp Ser Val Arg Arg Arg Gly Asp His Arg Leu Val  
 385 390 395 400  
 55  
 Gly Arg Arg Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu Pro Glu Gly Glu Arg Leu  
 405 410 415  
 60  
 Pro Arg Gln Ser Leu Thr Gln Leu Leu Arg Ala Gly Arg Phe Val Leu  
 420 425 430  
 65  
 Val His His Arg Ala Lys Ala Leu Ala Ala Asp Leu Arg Arg Asp Phe  
 435 440 445  
 70  
 Pro Gly Leu Gln Thr Ala Ser Ile Cys Glu Asp Ser His Asn Asn Ser  
 450 455 460

ES 2 329 358 T3

Leu Ser Ala Gly Glu Gly Val Ile Val Arg Pro Asp Gly Val Val Ile  
 465 470 475 480

5

Trp Val Gly Lys Lys Ser Thr Leu Ala Lys Glu Arg Leu Gly Glu Trp  
 485 490 495

10

Leu Leu Asp Asp Ser Lys Ser Ala Arg Gln Ser Leu Thr  
 500 505

15

<210> SEQ ID 12

<211> LONGITUD: 348

<212> TIPO: PRT

20

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

<400> SECUENCIA: 12

25

Met Ala His Tyr Asp Ser Val Gly Thr Ala Pro Gly Ala Ser Asp Asp  
 1 5 10 15

30

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

35

Arg Ser Asp Ala Lys Asn Asn Val Val Phe Leu Leu Ala Asp Gly Glu  
 35 40 45

40

Glu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Glu His Tyr Val Ser Gln Leu Ser Thr  
 50 55 60

45

Pro Glu Arg Glu Ala Ile Arg Leu Val Leu Asn Phe Glu Ala Arg Gly  
 65 70 75 80

50

Asn Gln Gly Ile Pro Leu Leu Phe Glu Thr Ser Gln Lys Asp Tyr Ala  
 85 90 95

55

Leu Ile Arg Thr Val Asn Ala Gly Val Arg Asp Ile Ile Ser Phe Ser  
 100 105 110

60

Phe Thr Pro Leu Ile Tyr Asn Met Leu Gln Asn Asp Thr Asp Phe Thr  
 115 120 125

65

Val Phe Arg Lys Lys Asn Ile Ala Gly Leu Asn Phe Ala Val Val Glu  
 130 135 140

ES 2 329 358 T3

Gly Phe Gln His Tyr His His Met Ser Asp Thr Val Glu Asn Leu Gly  
 145 150 155 160  
 5  
 Pro Glu Thr Leu Phe Arg Tyr Gln Lys Thr Val Arg Glu Val Gly Asn  
 165 170 175  
 10  
 His Phe Ile Gln Gly Ile Asp Leu Ser Ser Leu Ser Ala Asp Glu Asp  
 180 185 190  
 15  
 Ala Thr Tyr Phe Pro Leu Pro Gly Gly Thr Leu Leu Val Leu Asn Leu  
 195 200 205  
 20  
 Pro Thr Leu Tyr Ala Leu Gly Met Gly Ser Phe Val Leu Cys Gly Leu  
 210 215 220  
 25  
 Trp Ala Gln Arg Cys Arg Thr Arg Arg Gln His Gln Gly Lys Asn Cys  
 225 230 235 240  
 30  
 Val Leu Arg Pro Met Ala Ile Ala Leu Leu Gly Ile Ala Cys Ala Ala  
 245 250 255  
 35  
 Leu Val Phe Tyr Val Pro Ser Ile Ala Tyr Leu Phe Val Ile Pro Ser  
 260 265 270  
 40  
 Leu Leu Leu Ala Cys Ala Met Leu Ser Arg Ser Leu Phe Ile Ser Tyr  
 275 280 285  
 45  
 Ser Ile Met Leu Leu Gly Ala Tyr Ala Cys Gly Ile Leu Tyr Ala Pro  
 290 295 300  
 50  
 Ile Val Tyr Leu Ile Ser Ser Gly Leu Lys Met Pro Phe Ile Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Val Ile Ala Leu Leu Pro Leu Cys Leu Leu Ala Val Gly Leu Ala Gly  
 325 330 335  
 55  
 Val Ile Ala Arg Ser Arg Asp Cys Arg Thr Cys Asp  
 340 345

<210> SEQ ID 13

60 <211> Longitud: 572

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

65

ES 2 329 358 T3

<400> SECUENCIA: 13

5 Met Arg Ser Leu Lys Ile Ile Val Leu Ala Ser Ala Phe Asn Gly Leu  
1 5 10 15

10 Thr Gln Arg Ala Trp Leu Asp Leu Arg Gln Ser Gly His Ala Pro Ser  
20 25 30

15 Val Val Leu Phe Thr Asp Pro Ala Leu Val Cys Gln Gln Ile Glu Asp  
35 40 45

20 Ser Asp Ala Asp Leu Val Ile Cys Pro Phe Leu Lys Asp Arg Val Pro  
50 55 60

25 Gln Gln Leu Trp Ser Asn Leu Glu Arg Pro Val Val Ile Ile His Pro  
65 70 75 80

30 Gly Ile Val Gly Asp Arg Gly Ala Ser Ala Leu Asp Trp Ala Ile Ser  
85 90 95

35 Gln Gln Val Gly Arg Trp Gly Val Thr Ala Leu Gln Ala Val Glu Glu  
100 105 110

40 Met Asp Ala Gly Pro Ile Trp Ser Thr Cys Glu Phe Asp Met Pro Ala  
115 120 125

45 Asp Val Arg Lys Ser Glu Leu Tyr Asn Gly Ala Val Ser Asp Ala Ala  
130 135 140

50 Leu Tyr Cys Ile Arg Asp Val Val Glu Lys Phe Ala Arg Val Phe Val  
145 150 155 160

55 Pro Val Pro Leu Asp Tyr Thr Gln Ala His Val Ile Gly Arg Leu Gln  
165 170 175

60 Pro Asn Met Thr Gln Ala Asp Arg Thr Phe Ser Trp Tyr Asp Cys Ala  
180 185 190

65 Arg Phe Ile Lys Arg Cys Ile Asp Ala Ala Asp Gly Gln Pro Gly Val

ES 2 329 358 T3

|    | 195   |   | 200                     |                         | 205 |
|----|---|---|-------------------------|-------------------------|-----|
| 5  | Leu<br>210  | Ala Ser Ile Gln Gly                         | Gly Gln Tyr Tyr         | Leu Tyr Asp Ala His Leu | 220 |
| 10 | Asp<br>225  | Ala Arg His Gly Thr                         | Pro Gly Glu Ile         | Leu Ala Val Gln Asp Asp | 240 |
| 15 | Ala Val Leu Val   | Ala Ala Gly Asp Gln Ser                     | Leu Trp Ile Gly Ser Leu | 255                     |     |
| 20 | Lys Arg Lys Ala Arg   | Pro Gly Glu Glu Thr Phe Lys Leu Pro Ala Arg | 260                     | 265                     | 270 |
| 25 | His Val Leu Ala Glu Ala Leu Ala Asp Ile Pro Val Leu Asp Ser Ser | 275   | 280                     | 285                     |     |
| 30 | Ile Ala Asn Gln Met Phe Asp Glu Gln Ala Tyr Gln Pro Ile Arg Tyr | 290   | 295                     | 300                     |     |
| 35 | Arg Glu Ala Gly His Val Gly Glu Leu Thr Phe Glu Phe Tyr Asn Gly | 305   | 310                     | 315                     | 320 |
| 40 | Ala Met Ser Thr Glu Gln Cys Gln Arg Leu Val Ala Ala Leu Arg Trp | 325   | 330                     | 335                     |     |
| 45 | Ala Lys Thr Arg Asp Thr Gln Val Leu Val Ile Lys Gly Gly Arg Gly | 340   | 345                     | 350                     |     |
| 50 | Ser Phe Ser Asn Gly Val His Leu Asn Val Ile Gln Ala Ala Pro Val | 355   | 360                     | 365                     |     |
| 55 | Pro Gly Leu Glu Ala Trp Ala Asn Ile Gln Ala Ile Tyr Asp Val Cys | 370   | 375                     | 380                     |     |
| 60 | His Glu Leu Leu Thr Ala Arg Gln Leu Val Ile Ser Gly Leu Thr Gly | 385   | 390                     | 395                     | 400 |
| 65 | Ser Ala Gly Ala Gly Gly Val Met Leu Ala Leu Ala Ala Asp Ile Val | 405   | 410                     | 415                     |     |
|    | Leu Ala Arg Glu Ser Val Val Leu Asn Pro His Tyr Lys Thr Met Gly | 420   | 425                     | 430                     |     |

ES 2 329 358 T3

Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Trp Thr Tyr Ser Leu Pro Arg Ala Val Gly  
 435 440 445

5

Ser Glu Val Ala His Gln Leu Thr Asp Ala Cys Leu Pro Ile Ser Ala  
 450 455 460

10

Leu Gln Ala Glu Gln Tyr Gly Leu Val Gln Gly Ile Gly Pro Arg Cys  
 465 470 475 480

15

Pro His Ala Phe Ser Arg Trp Leu Met Gln Gln Ala Ser Ser Ala Leu  
 485 490 495

20

Thr Asp Glu Lys Tyr Ala Val Ala Arg Ala Arg Lys Ala Ala Leu Asp  
 500 505 510

25

Ile Asp Gln Ile Thr Arg Cys Arg Glu Ala Glu Leu Ala Gln Met Gln  
 515 520 525

30

Leu Asp Met Val His Asn Arg His Gln Phe Ala Glu Lys Cys Arg Asn  
 530 535 540

35

Phe Val Leu Lys Arg Lys Thr Cys Gln Thr Pro Gln Arg Leu Met Ala  
 545 550 555 560

40

Pro Trp Ala Val Ala Arg Glu Ala Ala Leu Val Gly  
 565 570

<210> SEQ ID 14

<211> Longitud: 230

45

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

50

<400> SECUENCIA: 14

Met Ile Gly Ile Val Ile Pro Ala His Asn Glu Glu Arg His Ile Ser  
 1 5 10 15

55

Ala Cys Leu Ala Ser Ile Gln Arg Ala Ile Ala His Pro Ala Leu Ala  
 20 25 30

60

His Gln Gln Val Gln Leu Leu Val Val Leu Asp Ala Cys Ser Asp Glu  
 35 40 45

65

ES 2 329 358 T3

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

<210> SEQ ID 15

60 <211> Longitud: 348

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Pseudomonas fluorescens* A2-2

65

ES 2 329 358 T3

<400> SECUENCIA: 15

5 Met His Pro His Lys Thr Ala Ile Val Leu Ile Glu Tyr Gln Asn Asp  
1 5 10 15

10 Phe Thr Thr Pro Gly Gly Val Phe His Asp Ala Val Lys Asp Val Met  
20 25 30

15 Gln Thr Ser Asn Met Leu Ala Asn Thr Ala Thr Thr Ile Glu Gln Ala  
35 40 45

20 Arg Lys Leu Gly Val Lys Ile Ile His Leu Pro Ile Arg Phe Ala Asp  
50 55 60

25 Gly Tyr Pro Glu Leu Thr Leu Arg Ser Tyr Gly Ile Leu Lys Gly Val  
65 70 75 80

30 Ala Asp Gly Ser Ala Phe Arg Ala Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ile Thr  
85 90 95

35 Asp Ala Leu Lys Arg Asp Pro Thr Asp Ile Val Ile Glu Gly Lys Arg  
100 105 110

40 Gly Leu Asp Ala Phe Ala Thr Thr Gly Leu Asp Leu Val Leu Arg Asn  
115 120 125

45 Asn Gly Ile Gln Asn Leu Val Val Ala Gly Phe Leu Thr Asn Cys Cys  
130 135 140

50 Val Glu Gly Thr Val Arg Ser Gly Tyr Glu Lys Gly Tyr Asp Val Val  
145 150 155 160

55 Thr Leu Thr Asp Cys Thr Ala Thr Phe Ser Asp Glu Gln Gln Arg Ala  
165 170 175

60 Ala Glu Gln Phe Thr Leu Pro Met Phe Phe Ala Asn Pro Ala Thr His  
180 185 190

65 Arg Val Ser Ala Ser Thr Glu Arg Arg Ile Lys Lys Ala Ala Thr Pro  
195 200 205

Ala Glu Ser Pro Leu Phe Cys Leu Gly His Ser Val Gly Ala Tyr Cys  
210 215 220

ES 2 329 358 T3

Ile Ser Pro Phe Pro Asn Asp Gln Ser Ser Arg Phe Thr Ser Thr Arg  
 225 230 235 240  
 5  
 Leu Ile His Thr Ser Ser Leu Arg Ser Pro Val Leu Ala Trp Met Pro  
 245 250 255  
 10  
 Ser Ala Met Asn Leu Lys Ala Phe Phe Thr Ser Met Leu Arg Pro Ala  
 260 265 270  
 15  
 Phe His Val Thr Trp Ile Asn Thr Ile Leu Gly Val Val Thr Pro Arg  
 275 280 285  
 20  
 Tyr Pro Ala Ala Gly Thr Ser Ser Ser Leu Ala Trp Arg Leu Met Ile  
 290 295 300  
 25  
 Trp Asn Leu Ser Cys Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Val Ile Ala Ala  
 305 310 315 320  
 30  
 Tyr Thr Thr Ser Pro Met Ala Val Ala Val Ser Val Glu Val Ser Ala  
 325 330 335  
 35  
 Ala Arg Ser Ile Arg Thr Lys Gly Met Asp Lys Ser  
 340 345  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65