



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 566**

51 Int. Cl.:
C12P 19/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03728046 .8**

96 Fecha de presentación : **08.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1502956**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Procedimiento para la producción de citidina 5'-difosfato colina.**

30 Prioridad: **08.05.2002 JP 2002-132917**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2009

73 Titular/es: **Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.**
1-6-1 Ohtemachi
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP

72 Inventor/es: **Hashimoto, Shin-ichi y**
Oda, Hideki

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de citidina 5'-difosfato colina.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de citidina 5'-difosfato colina.

Antecedentes de la técnica

10

La citidina 5'-difosfato colina (en lo sucesivo abreviada como CDP-colina) es un compuesto intermedio de biosíntesis de fosfatidilcolina (lecitina), que es un fosfolípido y es útil para el tratamiento de dolores de cabeza, trastornos de la consciencia tras la cirugía cerebral, enfermedad de Parkinson, hemiplejia postapopléjica, etc.

15

Los procedimientos conocidos para producir la CDP-colina incluyen procedimientos de síntesis química, procedimientos para producir la CDP-colina a partir de la citidina 5'-trifosfato (en lo sucesivo abreviada como CTP), citidina 5'-difosfato (en lo sucesivo abreviada como CDP), o citidina 5'-monofosfato (en lo sucesivo abreviada como CMP) utilizando células de microorganismos (solicitudes de patentes japonesas examinadas y publicadas nº 2358/73, nº 40758/73 y nº 2359/73), etc. Sin embargo, estos procedimientos resultan problemáticos porque el rendimiento es bajo, los materiales de partida son costosos, etc.

20

Los procedimientos publicados hasta el momento que utilizan microorganismos incluyen los procedimientos que utilizan microorganismos recombinantes y que utilizan, como materiales de partida, ácido orótico, y colina o fosforilcolina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 276974/93), uridina 5'-monofosfato (en lo sucesivo abreviada como UMP) y colina (o fosforilcolina) (WO 99/49073) y CMP y colina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 2001-103973). El ácido orótico, que es relativamente económico, es un material excelente como sustrato para estas reacciones, pero la utilización de materiales menos costosos hará posible además disminuir el coste de producción. Hasta el momento, no se ha publicado un procedimiento que utilice uracilo como sustrato menos costoso.

25

30

Exposición de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento eficaz para fabricar CDP-colina.

35

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de CDP-colina que utiliza colina o fosforilcolina económicas, o una sal de las mismas y uracilo como sustratos.

Es decir, la presente invención se refiere a los apartados (1) a (3) siguientes.

40

(1) Un procedimiento para producir CDP-colina, que comprende poner en contacto un biocatalizador con actividad para formar CDP-colina a partir de colina o fosforilcolina, o una sal de las mismas, y uracilo con colina o fosforilcolina, o una sal de las mismas, y uracilo en un medio acuoso, permitiendo que se forme y se acumule la CDP-colina en el medio acuoso; y recuperando la CDP-colina del medio acuoso;

45

y en el que biocatalizador comprende células seleccionadas de entre el grupo constituido por microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* o *Corynebacterium*, un cultivo de las células o una materia tratada de las células;

50

y en el que las células son transformados que pueden obtenerse introduciendo ADN que codifica la citidina 5'-trifosfato-sintetasa con actividad para formar citidina 5'-trifosfato a partir de uridina 5'-trifosfato, ADN que codifica la colina-cinasa con actividad para formar fosforilcolina a partir de la colina, o ADN que codifica la colina-fosfatocitidiltransferasa con actividad para formar CDP-colina a partir de citidina 5'-trifosfato y fosforilcolina.

55

2) Procedimiento según el apartado (1) anterior, en el que el microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium*, es la *Corynebacterium ammoniagenes*.

3) Procedimiento según el apartado (1) anterior, en el que el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* es la *Escherichia coli*.

60

En la presente invención, los biocatalizadores presentan actividad para formar CDP-colina a partir de colina o fosforilcolina, o de una sal de las mismas, y uracilo (en lo sucesivo abreviada como actividad para formar CDP-colina).

65

Las células con actividad para formar CDP-colina son microorganismos que pertenecen a los géneros *Escherichia* o *Corynebacterium*.

Ejemplos de microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* son los que pertenecen a *Escherichia coli* tales como *Escherichia coli* MM294, *Escherichia coli* XL1-azul, *Escherichia coli* XL2-azul, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia*

ES 2 329 566 T3

coli HB101, *Escherichia coli* n° 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* GI698 y *Escherichia coli* TB1.

Ejemplos de microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium* son los que pertenecen a *Corynebacterium glutamicum* (p. ej., *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 y *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869), *Corynebacterium ammoniagenes* (p. ej., *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 y *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170) y *Corynebacterium acetoacidophilum* (p. ej., *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870).

Es posible proporcionar actividad para formar CDP-colina a las células que no poseen actividad para formar CDP-colina introduciendo ADN que codifica una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina según un procedimiento ordinario o por fusión con otras células con actividad y utilizar las células obtenidas. Se prefieren los transformados obtenidos introduciendo el ADN que codifica una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina en las células de la siguiente manera.

Las enzimas relacionadas con la actividad para formar CDP-colina según la presente invención son la citidina 5'-trifosfato-sintetasa [EC 6.3.4.2] (PyrG) con actividad para formar CTD a partir de uridina 5'-trifosfato (UTP), colina-cinasa [EC 2.7.1.32] (CKI) con actividad para formar fosforilcolina a partir de colina, colinafosfato-citidiltransferasa [EC 2.7.7.15] (CCT) con actividad para formar CDP-colina a partir de CTP y fosforilcolina, etc.

Los ADN que codifican una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina son los ADN que codifican las enzimas anteriores PyrG, CKI o CCT.

El ADN que codifica a PyrG se ha clonado a partir del cromosoma de *Escherichia coli* y la secuencia nucleotídica completa de la misma se ha determinado [J. Biol. Chem., 261, 5568 (1986)]. Un ejemplo de la fuente de ADN que codifica a PyrG es pMW6, que es un plásmido en el que un fragmento *NruI-PstI* de 2426 pb que contiene el ADN que codifica a PyrG procedente de *Escherichia coli* se inserta en la secuencia *SmaI-PstI* en la secuencia de multiclonación del vector pUC8 de *Escherichia coli* [Gene, 19, 259 (1982)].

Con respecto al ADN que codifica a CCT, se ha determinado su secuencia nucleotídica completa [Eur. J. Biochem., 169, 477 (1987)]. Un ejemplo de la fuente de ADN que codifica a CCT es el plásmido pCC41 [Biochemistry, 60, 701 (1988)], que es un plásmido en el que el fragmento *DraI* de 1296 pares de bases (en lo sucesivo abreviado como pb) que contiene el ADN que codifica a CCT procedente de levadura se inserta en la secuencia *SmaI* en la secuencia de multiclonación del vector pUC18 de *Escherichia coli* [Gene, 33, 103 (1985)].

El ADN que codifica a CKI se ha clonado igualmente a partir de un cromosoma de levadura y se ha determinado su secuencia nucleotídica completa [J. Biol. Chem., 264, 2053 (1989)]. Un ejemplo de la fuente de ADN que codifica a CKI es el plásmido pCK1D, que es un plásmido en el que un fragmento *PstI-HindIII* de 2692 pb que contiene el ADN que codifica a CKI procedente de levadura se inserta en el vector lanzadera YEpm4 de levadura-*Escherichia coli* [Mol. Cell. Biol., 7, 29 (1987)].

El biocatalizador con actividad para formar CDP-colina puede obtenerse fácilmente en las etapas siguientes. Basándose en la información de la secuencia nucleotídica en los anteriores ADN que codifican una enzima en relación con la actividad para formar CDP-colina, se obtiene dicho ADN según, por ejemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Sambrook, et al. ed., Cols Spring Harbor Laboratory (2001) (abreviado en lo sucesivo como Molecular Cloning, tercera edición). El ADN obtenido se inserta en un vector de expresión para preparar un ADN recombinante, que se utiliza para transformar las células anteriores como células hospedadoras. A partir del transformado resultante, puede obtenerse el biocatalizador con actividad para formar CDP-colina.

Por ejemplo, el ADN que codifica a PyrG, CCT o CKI se obtiene a partir de los plásmidos pMW6, pCC41, o pCK1D anteriores, y el ADN obtenido se utiliza para preparar un fragmento de ADN de una longitud apropiada que contiene una zona que codifica al polipéptido según se necesite.

Si es necesario, se prepara el ADN en el que un nucleótido en la secuencia nucleotídica de la zona que codifica una enzima en relación con la actividad para formar CDP-colina se sustituye a fin de preparar un codón más adecuado para la expresión en una célula huésped. El ADN es útil para la expresión eficaz de una enzima en relación con la actividad para formar CDP-colina.

El fragmento de ADN o el ADN completo que codifica una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina se inserta corriente abajo de un activador en un vector de expresión apropiado para preparar un vector recombinante. Pueden insertarse fragmentos de ADN en los respectivos vectores de expresión o pueden insertarse varios ADN en un vector de expresión.

El vector recombinante se introduce en una célula huésped adecuada para el vector de expresión.

Ejemplos de células hospedadoras adecuadas son las células descritas anteriormente.

Los vectores de expresión útiles son los capaces de multiplicarse de manera autónoma o integrarse en el cromosoma en las células hospedadoras y que comprenden un activador en una posición apropiada para transcribir el ADN que codifica una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina.

ES 2 329 566 T3

Para la bacteria utilizada como célula hospedadora, se prefiere que el vector recombinante que comprende el ADN que codifica el olipéptido de la presente invención sea capaz de multiplicarse de manera autónoma en el procariota y comprende un activador, una secuencia que se une al ribosoma, el ADN de la presente invención y una secuencia de terminación de la transcripción. El vector recombinante puede comprender además un gen que regula el activador.

Los vectores de expresión adecuados incluyen pBTrp2, pBTac1 y pBTac2 (disponibles todos en Boehringer-Mannheim), pKK233-2 (Pharmacia), pSE280 (Invitrogen), pGEMEX-1 (Promega), pQE8 (QIAGEN), pKYP10 (solicitud de patente japonesa sin examinar publicada n° 110600/83), pKYP200 [*Agric. Biol. Chem.*, 48, 669 (1984)], pLSA1 [*Agric. Biol. Chem.*, 53, 277 (1989)], pGEL1 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (Stratagene), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400), solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n° 221091/85], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* TGKA2 (FERM BP-6798), solicitud de patente japonesa sin examinar publicada n° 221091/85], pTerm2 (US4686191, US4939094, US5160735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400 [*J. Bacteriol.*, 172, 2392 (1990)], pGEX (Pharmacia) y el sistema pET (Novagen).

Como activador, puede utilizarse cualquier activador capaz de funcionar en las células hospedadoras. Por ejemplo, pueden utilizarse activadores procedentes de *Escherichia coli*, o del fago, tales como el activador trp (P_{trp}), activador lac, activador P_L , activador P_R , y activador T7. Pueden utilizarse también activadores diseñados y modificados artificialmente tales como un activador en el que se combinan dos P_{trp} en tándem ($P_{trp} \times 2$), activador tac, activador lacT7 y activador let I, etc.

Es preferible utilizar un plásmido en el que la distancia entre la secuencia de Shine-Dalgarno (secuencia que se une al ribosoma) y el codón de iniciación se ajusta a una longitud apropiada (p. ej., 6 a 18 nucleótidos).

En el vector recombinante de la presente invención, la secuencia de terminación de la transcripción no es esencial para la expresión del ADN que codifica una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina, pero es preferible colocar la secuencia de terminación de la transcripción inmediatamente corriente abajo del gen estructural.

La introducción del vector recombinante puede realizarse por cualquiera de los procedimientos de introducción del ADN en las células hospedadoras anteriores, por ejemplo, el procedimiento que utiliza ión calcio [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69, 2110 (1972)], el método del protoplasto (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n° 248394/88) y los procedimientos descritos en *Gene*, 17, 107 (1982) y *Molecular & General Genetics*, 168, 111 (1979).

Dos o más tipos diferentes de células pueden combinarse apropiadamente para obtener la actividad de biosíntesis de CDP-colina y utilizarse como células con actividad de biosíntesis de CDP-colina.

El ADN anterior que codifica una enzima relacionada con la actividad para formar CDP-colina puede introducirse en la célula según un procedimiento convencional, mediante el cual puede obtenerse una célula con una actividad aumentada para formar CDP-colina.

Asimismo, en el caso de las células con actividad para formar CDP-colina, pueden unirse dos o más tipos diferentes de células en combinación.

Un ejemplo de la combinación es el de un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* y un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*.

Cualquier medio natural y medio sintético puede utilizarse como medio para cultivar las células siempre que sea un medio apto para el cultivo eficaz de las células que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, etc. que pueden ser asimiladas por las células.

Como fuentes de carbón, puede utilizarse cualquier fuente de carbono que pueda ser asimilada por las células. Ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, molasas que los contienen almidón hidrolizado de almidón; ácidos orgánicos tales como el ácido acético y el ácido propiónico; y alcoholes tales como etanol y propanol.

Ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen amoníaco, sales de amonio de los ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como cloruro amónico, sulfato amónico, acetato amónico y fosfato amónico, otros compuestos que contienen nitrógeno, peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maíz fermentado, hidrolizado de caseína, torta de soja, hidrolizado de torta de soja y varias células microbianas fermentadas y los productos digeridos de las mismas.

Ejemplos de sales inorgánicas incluyen fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico bipotásico, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato cálcico.

El cultivo se lleva a cabo en condiciones anaerobias, por ejemplo, agitando el cultivo o sumergiendo el cultivo de la centrifugadora bajo aireación. La temperatura del cultivo preferentemente está comprendida entre 15 y 50°C, y el

ES 2 329 566 T3

periodo de cultivo normalmente es de 16 horas a 7 días. El pH se mantiene preferentemente entre 3,0 y 9,0 durante el cultivo. El ajuste del pH se realiza utilizando un ácido orgánico o inorgánico, una solución alcalina, urea, carbonato cálcico, amoníaco acuoso, etc.

5 Cuando la célula es un transformado y el ADN recombinante utilizado para la transformación transporta un gen con resistencia a antibióticos, un antibiótico correspondiente al gen con resistencia a antibióticos transportado por el ADN recombinante puede añadirse al medio para el cultivo de células.

10 Cuando se utilizan como biocatalizador dos o más tipos diferentes de células, cultivos de células o las materias tratadas de las células, pueden utilizarse las que se obtienen cultivando estas células por separado o en el mismo medio según los procedimientos anteriores.

15 Cuando dos o más tipos diferentes de células se cultivan en el mismo medio, estas células pueden cultivarse simultáneamente, o durante o después del cultivo de un tipo de células, el otro tipo de células puede añadirse al medio de cultivo.

Las combinaciones de dos o más tipos diferentes de células pueden ser entre cualquier célula seleccionada de entre el grupo definido anteriormente.

20 Ejemplos de las combinaciones de un microorganismo y un microorganismo incluyen cualquier combinación de los microorganismos anteriores, en particular combinaciones de los microorganismos que pertenecen a los géneros seleccionados de entre el grupo constituido por los géneros *Escherichia* y *Corynebacterium*.

25 Las materias tratadas de las células anteriores utilizadas como biocatalizador con actividad para formar CDP-colina incluyen concentrados de materias secas del cultivo obtenido anteriormente de las células obtenidas por concentración o secado del cultivo de las células con un concentrador o un secador, las células obtenidas sometiendo el cultivo de las células a una separación sólido-líquido por filtración o centrifugación, las materias secadas de las células obtenidas secando las células con un secador, etc. por ejemplo, las materias tratadas con un tensioactivo o un disolvente orgánico de las células obtenidas tratadas con un tensioactivo o un disolvente orgánico y las materias tratadas con enzimas citolíticas obtenidas tratando las células con una enzima citolítica tal como una lisozima.

35 Las enzimas en bruto o las enzimas purificadas obtenidas sometiendo las materias tratadas anteriormente de las células por los procedimientos ordinarios para la purificación de enzimas tales como salado, precipitación isoelectrica, precipitación con disolvente orgánico, diálisis y varias cromatografías pueden utilizarse también como materias tratadas de las células.

40 Cuando se utilizan dos o más tipos de células, las materias tratadas por separado preparadas a partir de dos o más tipos de células pueden utilizarse por separado como biocatalizadores con actividad de biosíntesis de CDP-colina, o una mezcla de estas materias tratadas puede utilizarse como catalizador con actividad de biosíntesis de CDP-colina.

Las células anteriores o las materias tratadas de las mismas pueden utilizarse también como biocatalizador después de ser inmovilizadas en un vehículo insoluble en agua o un gel.

45 El procedimiento para producir la CDP-colina se describe con detalle a continuación.

La CDP-colina puede producirse poniendo en contacto el biocatalizador anterior con sustratos en un medio acuoso, lo que permite a la CDP-colina formarse y acumularse en el medio acuoso y recuperar la CDP-colina del medio acuoso.

50 En particular, el biocatalizador anterior se mezcla con colina o fosforilcolina o una sal de las mismas, y uracilo como sustratos en un medio acuoso, y la mezcla resultante es, si es necesario, con adición de otros componentes, se deja reposar entre 20 y 50°C durante un periodo comprendido entre 2 y 48 horas, durante las cuales el pH se mantuvo entre 5 y 10, preferentemente entre 6 y 8.

55 La cantidad de biocatalizador que debe utilizarse varía dependiendo de la actividad específica, etc. del catalizador. Por ejemplo, cuando se utiliza como biocatalizador un cultivo o materia tratada de las células, es apropiado utilizarlo en una cantidad entre 5 y 500 mg, preferentemente entre 10 y 300 mg (en términos de las células húmedas obtenidas centrifugando el cultivo o la materia tratada de las células) por mg de uracilo.

60 La colina, la fosforilcolina y sus sales incluyen colina, haluros de colina tales como cloruro de colina, bromuro de colina y yoduro de colina, bicarbonato de colina, bitartrato de colina, sulfato de metilcolina, citrato dibásico de colina, fosforilcolina y haluro de fosforilcolina, tales como cloruro de fosforilcolina. Se prefieren los haluros de colina o fosforilcolina, entre los que se utilizan más preferentemente cloruro de colina y cloruro de fosforilcolina.

65 La colina o la fosforilcolina, o una sal de las mismas, y el uracilo pueden obtenerse por síntesis química o por fermentación utilizando microorganismos. No son necesariamente muy purificados y pueden contener impurezas tales como sales siempre que las impurezas no inhiban la reacción de formación de CDP-colina. Pueden utilizarse también los disponibles en el mercado.

ES 2 329 566 T3

La concentración de colina o fosforilcolina, o de una sal de las mismas, y de uracilo es preferentemente de 1 mmol/l a 1 mol/l, más preferentemente entre 10 y 200 mmoles/l.

Otros componentes que deben añadirse según la necesidad incluyen los donantes de energía, iones fosfato, iones magnesio, iones amonio, tensioactivos y disolventes orgánicos. Estos componen no necesitan añadirse cuando se suministran en cantidades suficientes en el biocatalizador, etc.

Ejemplos de donantes de energía son los carbohidratos (p. ej., glucosa, fructosa y sacarosa), molasas, hidrolizado de almidón ácidos orgánicos (p. ej., ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético y ácido α -cetoglutarico) y aminoácidos (p. ej., glicina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico). El donante de energía se utiliza preferentemente a una concentración de 0,02 a 2,0 moles/l.

Como ión fosfato, pueden utilizarse, ácido ortofosfórico, ácido pirofosfórico, ácidos polifosfóricos (p. ej. ácido tripolifosfórico y ácido tetrapolifosfórico), ácido polimetafosfórico, fosfatos inorgánicos (p. ej. fosfato potásico, fosfato monobásico dipotásico, fosfato dibásico sódico y fosfato monobásico disódico), etc. El ión fosfato se utiliza preferentemente a una concentración entre 10 y 500 mmoles/l.

Como ión magnesio, pueden utilizarse sales inorgánicas de magnesio (p. ej., sulfato magnésico, nitrato magnésico y cloruro magnésico), sales orgánicas de magnesio (p. ej., citrato magnésico), etc. El ión magnesio se utiliza preferentemente a una concentración entre 5 y 200 mmoles/l.

Como ión amonio, pueden utilizarse, los contenidos en amoniaco acuoso, gas amoniaco, varias sales inorgánicas u orgánicas de amonio, extracto de levadura, licor de maíz fermentada, etc. Pueden utilizarse también como ión amonio las fuentes de nutrientes orgánicos que contienen iones amonio tales como glutamina y casaminoácido. El ión amonio se utiliza preferentemente a una concentración entre 10 mmoles/l y 2 moles/l.

Como tensioactivo, puede utilizarse cualquier tensioactivo que favorezca la formación de CDP-colina. Ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen los tensioactivos aniónicos tales como dioctilsulfosuccinato sódico (p. ej., Rapisol B-80, NOF Corporation) y sarcosinato de lauroilo, tensioactivos no iónicos tales como el éter cetílico de polioxietileno (p. ej. Nonion P-208, NOF Corporation) y aminas terciarias tales como alquil dimetilamina (p. ej., Amina terciaria FB. NOF Corporation). El tensioactivo se utiliza normalmente a una concentración comprendida entre 0,1 y 100 g/l, preferentemente entre 1 y 50 g/l.

Ejemplos de disolventes orgánicos adecuados son xileno, tolueno, alcoholes alifáticos (p. ej., alcohol etílico, alcohol metílico y alcohol butílico), acetona, acetato de etilo y sulfóxido de dimetilo. El disolvente orgánico se utiliza normalmente a una concentración de entre 0,1 y 100 ml/l, preferentemente entre 1 y 50 ml/l.

El medio acuoso adecuado incluye agua y tampones como tampón fosfato, tampón HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-etansulfónico), tampón Tris hidrocloreuro de [(hidroximetil)aminometano].

Además, un medio utilizado como biocatalizador para cultivar las células, un cultivo de las células y un sobrenadante del cultivo pueden utilizarse también como medio acuoso. Cuando el medio, el cultivo, el sobrenadante del cultivo, etc. se utilizan como medio acuoso y las células se utilizan como biocatalizador, las células pueden ponerse en contacto con la colina o la fosforilcolina, o una sal de las mismas, y el uracilo durante el cultivo o después de la terminación del cultivo. El medio para las células y las condiciones de cultivo son los mismos que los descritos anteriormente.

De esta manera, la CDP-colina puede formarse y acumularse en el medio acuoso. La CDP-colina formada y acumulada puede aislarse y purificarse por los procedimientos ordinarios para el aislamiento y la purificación tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de adsorción y el salado.

Determinadas formas de realización de la presente invención se ilustran en los ejemplos siguientes.

Mejores modos de poner en práctica la invención

Ejemplo 1

La MM294/pCKG55 de *Escherichia coli* (solicitud de patente japonesa sin examinar publicada n° 276974/93, FERM BP-3717), que es una cepa obtenida introduciendo el plásmido pCKG55 que lleva el gen CCT y el gen CKI procedente de la levadura y el gen PyrG en la MM294 de la *Escherichia coli* se inoculó en 200 ml de medio L [10 g/l de bacto-triptona(Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco) y 5 g/l de cloruro sódico, pH 7,2] que contiene 50 mg/l de ampicilina y un matraz Erlenmeyer de 2 l con tabiques, seguido de agitación rotativa del cultivo a 220 rpm a 25°C durante 24 horas. El cultivo obtenido (20 ml) se inoculó en 2,5 l de un medio líquido que comprende 5 g/l de glucosa (esterilizada por separado), 5 g/l de peptona (Kyokuto Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.), 6 g/l de fosfato disódico, 3 g/l de fosfato dibásico de potasio, 1 g/l de cloruro amónico, 250 mg/l de sulfato magnésico heptahidratado (esterilizado por separado) y 4 mg/l de vitamina B₁ (esterilizada por separado) (pH sin ajustar) en un fermentador de 5 l, seguido de cultivo a 28°C con agitación (600 rpm) y aireación (2,5 l/minuto). El pH se mantuvo a 7,0 con 14% (v/v) de amoniaco acuoso durante el cultivo.

ES 2 329 566 T3

Durante el cultivo, se tomaron muestras del cultivo y se midió la concentración de glucosa en los sobrenadantes obtenidos centrifugando las muestras. Cuando la concentración de glucosa en el sobrenadante fue cero, se recuperaron asépticamente 250 ml del cultivo.

El cultivo recuperado se inoculó en 2,5 l de un medio líquido que comprendía 5 g/l de glucosa (esterilizada por separado), 5 g/l de peptona (Kyokuto Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.), 6 g/l de fosfato disódico, 3 g/l de fosfato dibásico de potasio, 1 g/l de cloruro amónico, 250 mg/l de sulfato de magnesio heptahidratado (esterilizado por separado) y 4 mg/l de vitamina B₁ (esterilizada por separado) (pH sin ajustar) en un fermentador de 5 l, seguido de cultivo a 28°C con agitación (600 rpm) y aireación (2,5 l/minuto). El pH se mantuvo a 7,0 con 14% (v/v) de amoniaco acuoso durante el cultivo.

La adición de una solución de alimentación que comprende 167 g/l de glucosa y 167 g/l de peptona al cultivo utilizando una bomba peristáltica se inició 11 horas después del comienzo del cultivo y se continuó durante 13 horas a un caudal de 30 ml/hora.

Por separado, se inoculó ATCC 21170 de *Corynebacterium ammoniagenes*, en 200ml de un medio líquido que comprende 50 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona (Daigo Eiyo Kagaku Co., Ltd.), 10 g/l de extracto de levadura (Daigo Eiyo Kagaku Co., Ltd.), 5 g/l de urea, 5 g/l de sulfato amónico, 1 g/l de fosfato dibásico de potasio, 3 g/l de fosfato monobásico dipotásico, 1 g/l de sulfato magnésico heptahidratado, 0,1 g/l de cloruro cálcico dihidratado, 10 mg/l de sulfato ferroso heptahidratado, 10 mg/l de sulfato de zinc heptahidratado, 20 mg/l de sulfato de manganeso tetra a hexahidratado, 20 mg/l de L-cisteína, 10 mg/l de D-pantotenato cálcico, 5 mg/l de vitamina B₁, 5 mg/l de ácido nicotínico y 30 µg/l de biotina (pH ajustado a 7,2 con hidróxido sódico) en un matraz Erlenmeyer de 2 l con tabiques, seguido de cultivo en agitación rotativa a 220 rpm a 28°C durante 24 horas. El cultivo obtenido (20 ml) se inoculó en 2,5 l de un medio líquido que comprende 100 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 1 g/l de fosfato dibásico de potasio, 1 g/l de fosfato monobásico dipotásico, 1 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,1 g/l de cloruro de calcio dihidratado, 20 mg/l de sulfato ferroso heptahidratado, 10 mg/l de sulfato de zinc heptahidratado, 20 mg/l de sulfato de manganeso tetra a hexahidratado, 15 mg/l de β-alanina, 20 mg/l de L-cisteína, 0,1 mg/l de biotina, 2 g/l de urea (esterilizada por separado) y 5 mg/l de vitamina B₁ (esterilizada por separado) (pH ajustado a 7,2 con hidróxido sódico) en un fermentador de 5 l, seguido de cultivo a 32°C con agitación (600 rpm) y aireación (2,5 l/minuto). El pH se mantuvo en 6,8 con amoniaco acuoso concentrado durante el cultivo.

Durante el cultivo, se tomaron muestras del cultivo y se midió la concentración de glucosa en los sobrenadantes obtenidos centrifugando las muestras. Cuando la concentración de glucosa en el sobrenadante llegó a ser cero, se recuperaron asépticamente 350 ml del cultivo. El cultivo recuperado se inoculó en 2,5 l de un medio líquido que comprende 180 g/l de glucosa, 10 g/l de fosfato dibásico de potasio, 10 g/l de fosfato monobásico dipotásico, 10 g/l de sulfato magnésico heptahidratado, 0,1 g/l de cloruro cálcico dihidratado, 20 mg/l de sulfato ferroso heptahidratado, 10 mg/l de sulfato de zinc heptahidratado, 20 mg/l de sulfato de manganeso tetra a hexahidratado, 15 mg/l de β-alanina, 1 g/l de glutamato sódico, 20 mg/l de L-cisteína, 0,1 mg/l de biotina, 2 g/l de urea (esterilizada por separado) y 5 mg/l de vitamina B₁ (esterilizada por separado) (pH ajustado a 7,2 con hidróxido sódico) en un fermentador de 5 l, seguido de cultivo a 32°C en agitación (600 rpm) y aireación (2,5 l/minuto). El pH se mantuvo a 6,8 con amoniaco acuoso concentrado durante el cultivo. Durante el cultivo, se tomaron muestras del cultivo y se midió la concentración de glucosa en los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de las muestras. Se completó el cultivo cuando la concentración de glucosa en el sobrenadante llegó a ser cero.

Los cultivos MM294-pCKG55 de *Escherichia coli* (500 ml) y de ATCC 21170 (185 ml) de *Corynebacterium ammoniagenes* obtenidos de este modo se pusieron en cada uno de dos fermentadores de 2 l y 80 ml de una solución de glucosa al 60% (p/v), 25 ml de sulfato magnésico heptahidratado al 25% (p/v) y 160 ml de fosfato dibásico de potasio al 25% (p/v) se añadieron a éstos. A la mezcla resultante se añadieron además xileno y cloruro de colina a concentraciones de 20 ml/l y 8,4 g/l (60 mM), respectivamente.

A uno de los dos fermentadores (recipiente 1) se añadió uracilo (Sigma) a una concentración de 44 mmoles/l y al otro (recipiente 2) se añadió ácido orótico (Sigma) hasta una concentración de 44 mmoles/l. Cada fermentador se dejó en reposo a 32°C en agitación (800 rpm) y aireación (0,2 l/minuto). El pH se mantuvo a 7,2 con hidróxido sódico 10 N. Después de 22 horas, se midió por HPLC la concentración de CDP-colina en la mezcla. Se puso de manifiesto que 12,1 g/l (24,8 mmoles/l) de CDP-colina se formaba en el recipiente 1 y 11,5 g/l (23,6 mmoles/l) en el recipiente 2. Se obtuvo un resultado mejor con la utilización de uracilo como sustrato que con el ácido orótico.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un procedimiento industrialmente ventajoso para producir CDP-colina a partir de colina o fosforilcolina, o una sal de las mismas y uracilo.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para producir CDP-colina, que comprende poner en contacto un biocatalizador con actividad para formar CDP-colina a partir de colina o fosforilcolina, o una sal de las mismas, y uracilo con colina o fosforilcolina, o una sal de las mismas, y uracilo en un medio acuoso; permitiendo que se forme y se acumule la CDP-colina en el medio acuoso; y recuperando la CDP-colina del medio acuoso;

10 y en el que biocatalizador comprende unas células seleccionadas de entre el grupo constituido por unos microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* o *Corynebacterium*, un cultivo de las células o una materia tratada de las células;

15 y en el que las células son transformados que pueden obtenerse introduciendo ADN que codifica la citidina 5'-trifosfato-sintetasa con actividad para formar citidina 5'-trifosfato a partir de uridina 5'-trifosfato, ADN que codifica la colina-cinasa con actividad para formar fosforilcolina a partir de la colina, o ADN que codifica la colina-fosfato-citidiltransferasa con actividad para formar CDP-colina a partir de citidina 5'-trifosfato y fosforilcolina.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* es la *Corynebacterium ammoniagenes*.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* es la *Escherichia coli*.

25

30

35

40

45

50

55

60

65