



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 228**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12P 17/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03769305 .8**

86 Fecha de presentación : **23.09.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1543126**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54

Título: **Un gen que codifica para la vitamina B₆-fosfato-fosfatasa y su uso.**

30

Prioridad: **27.09.2002 EP 02021622**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73

Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72

Inventor/es: **Hoshino, Tatsuo;**
Nagahashi, Yoshie y
Tazoe, Masaaki

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 297 228 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un gen que codifica para la vitamina B₆-fosfato-fosfatasa y su uso.

5 La presente invención, se refiere a un nuevo gen de B₆-fosfato-fosfatasa (VB6P-fosfatasa) y a microorganismos recombinantes transformados con un vector que tiene el citado gen. La presente invención, se refiere, también, a un procedimiento para preparar vitamina B₆ a partir de VB6P, utilizando los microorganismos recombinantes o el polipéptido.

10 “Vitamina B₆”, tal y como se utiliza en la presente invención, incluye al piridoxol (al cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como PN), al piridoxal y a la piridoxamina. La vitamina B₆, es una vitamina indispensable para los seres humanos u otros animales, y se utiliza como primera materia para medicina, o como aditivos para alimentos.

15 La presente invención, proporciona microorganismos recombinantes transformados con un nuevo gen de VB6P fosfatasa (a saber, el pdxP), el cual se clona a partir de *Sinorhizobium meliloti*.

20 La presente invención, proporciona un procedimiento para producir vitamina B₆, a partir de VB6P, utilizando un extracto exento de células (al cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como CFE) o los microorganismos y contactar la VB6P con (i) el CFE, o (ii) preparación de la enzima adicionalmente purificada a partir del CFE anteriormente citado, en presencia de Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Sn²⁺, ó Ni²⁺, y aislando la vitamina B₆ resultante, a partir de la mezcla de reacción.

25 La presente invención, proporciona un ácido desoxirribonucleico aislado (DNA) que codifica VB6P-fosfatasa y microorganismos recombinantes, los cuales son capaces de producir vitamina B₆, a partir de VB6P, procediendo a introducir vectores que tienen el DNA aislado.

30 Un gen VB6P fosfatasa (pdxP) al que se hace aquí referencia, significa el gen que codifica una VB6P-fosfatasa que cataliza la desforilización de VB6P a vitamina B₆, con una alta especificidad del sustrato en piridoxol fosfato y piridoxal fosfato.

35 El término “aislado”, cuando se aplica al DNA, significa que, el DNA, se ha eliminado de su entorno medioambiental genético y se encuentra así, de este modo, exento de otras secuencias codificantes extrañas o no deseadas, y se encuentra en una forma apropiada para su uso en sistemas de producción de proteínas diseñadas mediante ingeniería genética. El término “un DNA aislado”, se denomina, de una forma alternativa, como “DNA clonado”.

40 El término “vector”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una molécula de DNA, lineal o circular, la cual se deriva, de una forma general, de un plásmido o DNA vírico, o puede contener ambos elementos. El vector, puede ser uno que sea independiente de replicación de cromosomas, o uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica conjuntamente con el cromosoma o cromosomas en los que éste se encuentra integrado.

45 El término “microorganismo recombinante”, se refiere a cualquier microorganismo transformado con un vector que comprende el DNA aislado de interés. Los microorganismos recombinantes de la presente invención, expresan un gen que codifica para la VB6P-fosfatasa para la preparación de vitamina B₆, a partir de VB6P.

50 La publicación de patente interracial WO 03/000 875, la cual ha sido publicada después de la fecha de prioridad de la presente solicitud de patente, da a conocer la purificación cromatográfica de la vitamina B₆-fosfato-fosfatasa. Este documento, es relevante, no obstante, únicamente en cuanto a lo referente a la novedad [Artículo 54(3) EPC].

La patente europea EP 0 950 715, da a conocer un procedimiento para la producción, exenta de células, de vitamina B₆, utilizando un sistema exento de células derivado de la *S. meliloti*.

Clonación del gen de la VB6P fosfatasa

55 La proteína purificada de la VB6P-fosfatasa de *S. meliloti*, por ejemplo, se digiere con una proteasa apropiada tal como la tripsina y los péptidos resultantes, se fraccionan utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Las secuencias de aminoácido de los péptidos, se determinan mediante la utilización de un secuenciador de proteínas y se sintetizan cebadores de degeneración en base a las secuencias de aminoácidos de los péptidos. Se obtiene un fragmento parcial de un gen de VB6P-fosfatasa, con los cebadores de degeneración. Se obtiene una longitud total del gen de VB6P-fosfatasa, procediendo al rastreo de una biblioteca genómica, utilizando el fragmento parcial resultante como una sonda.

65 Un ejemplo para un fragmento de DNA apropiado, se deriva de la *S. meliloti*, ilustrándose, la secuencia nucleotídica, como SEQ ID NO:9.

En el caso de *S. meliloti*, la secuencia genómica completa, ha sido publicada (EMBL, nº de acceso, AL 591 688), y la búsqueda BLAST, muestra el hecho de que, la secuencia de DNA del pdxP de la *S. meliloti*, representada en la

SEQ ID NO:9, corresponde a la región 472329 - 473036, complemento, marco de lectura abierto SMC01730, en el nº de acceso AL 591 688 (EMBL), excepto para una substitución de nucleótido, es decir, el nucleótido en la posición 163, pero la función de polipéptido representada en el marco de lectura abierto SMC01730, no ha sido identificada anteriormente.

Un equivalente funcional de la *S. meliloti* pdxP, puede aislarse a partir de cualquier organismo, tal como el *Mesorhizobium loti*, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éste, otras bacterias, levaduras y plantas.

La presente invención, proporciona secuencias de DNA que codifican para una VB6P-fosfatasa, tal y como se representa en la SEQ ID NO:9, así como secuencias de DNA las cuales hibridan bajo condiciones estándar, con las secuencias representadas en la SEQ ID NO:9, ó fragmentos de ésta.

El término "secuencias de DNA que hibridan bajo condiciones estándar", tal y como se describe aquí, en este documento, se refiere a DNA susceptible de poder ser obtenido mediante la utilización de hibridación de colonias, hibridación de placas, o hibridación de Southern, en donde se utiliza cualquier secuencia de DNA mostrada en la SEQ ID NO:9, como sonda.

"Condiciones estándar" para la hibridación, significa, en este contexto, las condiciones que generalmente se utilizan por parte de una persona experta en el arte especializado de la técnica, para detectar la señales específicas de hibridación o, de una forma preferible, las denominadas condiciones de hibridación severa y de lavado no severo o, de una forma más preferible, las denominadas condiciones moderadamente severas o, de una forma incluso más preferible, las denominadas condiciones de hibridación severa y de lavado severo, con las que una persona experta en el arte especializado de la técnica, se encuentra familiarizado. Un ejemplo específico de éstas, es un DNA que puede identificarse procediendo a someterlo a hibridación, utilizando el equipo, a modo de "kit", de marcaje y detección de DNA de digoxigenina (a la cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como DIG) (equipo a modo de "kit", de la firma Roche Diagnostics, Tokio, Japón), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La solución de hibridación, contiene 50% formamida, 5 x SSC (10 x SSC, se compone de 87,65 g de NaCl y 44,1 g de citrato sódico, en 1 litro), 2% de reactivo bloqueante (Roche Diagnostics, Tokio, Japón), 0,1% de N-lauroilsarcosina, y 0,3% dodecilsulfato sódico (al cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como SDS). La hibridación, puede realizarse durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 42°C y, a continuación, procediendo a lavar, dos veces, en 2 x SSC, que contiene 0,1% SDS, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a la temperatura ambiente, y dos veces en 0,1 x SSC que contiene 0,1% SDS, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 50°C a 68°C. La detección, puede realizarse tal y como se indica por parte del fabricante.

La presente invención, incluye, también, secuencias de DNA que son por lo menos un 70%, de una forma preferible, por lo menos un 80% y, de una forma particularmente, preferida, más de un 90% idénticas, a la secuencia de DNA de la SEQ ID NO:9, ó un fragmento de ésta.

Células huésped y vectores

Las células huésped apropiadas para la producción recombinante de vitamina B₆ a partir de VB6P, mediante la expresión de VB6P-fosfatasa, puede ser, o bien ya sea procariótica, o bien ya sea eucariótica, y se limitará únicamente por su capacidad para expresar enzimas activas. En una forma de presentación, la *Escherichia coli* recombinante, se proporciona en la presente invención. Como cepas huésped, pueden utilizarse cualesquiera cepas pertenecientes al género *Escherichia*, y el microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, puede aislarse a partir de fuentes naturales, o puede adquirirse de procedencia de colecciones de cultivos. De una forma preferible, para la presente invención, puede utilizarse el *E. coli* JM109 (Takara, Shiga, Japón). Los vectores apropiados que pueden mantenerse en *E. coli*, y utilizarse para la expresión de DNA recombinante, en *E. coli*, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a las plásmidos de la serie pUC, pBR322, y sus derivados, tales como el pKK223-3.

En otra forma de presentación, en la presente invención, se proporciona el *S. meliloti* recombinante. Como cepa huésped, puede utilizarse cualquier cepa perteneciente al género *Sinorhizobium* y, el microorganismo perteneciente al género *Sinorhizobium*, puede aislarse a partir de fuentes naturales, o puede adquirirse de colecciones de cultivos. De una forma preferible, para la presente invención, puede utilizarse el *S. meliloti* IFO 14782 (DSM 10226). Como vector para la expresión de DNA recombinante, en *S. meliloti*, puede utilizarse un vector de amplia extensión del huésped, tal como los pVK100, pRK290, pLAFR1 ó RSF1010. Un plásmido que expresa proteína recombinante en *S. meliloti*, puede proporcionarse procediendo a insertar un fragmento de DNA que codifica a un promotor que funciona en el *S. meliloti*, tal como ptac, plac, ptrc, pS1 (promotor de una pequeña subunidad ribosómica de *S. meliloti*), ó pNM (promotor de gen resistente a la neomicina).

Un plásmido recombinante para la incorporación del pdxP, puede introducirse en el *S. meliloti* IFO 14782, mediante tri-apareamiento paternal, de la forma que se describe a continuación. Se procede a cultivar separadamente y a mezclar conjuntamente, *S. meliloti*, como cepa destinataria, plásmido helper hospedante de *E. coli*, como cepa helper, y plásmido donante hospedante de *E. coli*, como cepa donante. Después del cultivo mezclado, en placa, puede seleccionarse la *S. meliloti* que recibe un plásmido recombinante, en placa de agar que contiene antibióticos apropiados. La cepa recombinante que porta los plásmidos, se selecciona, mediante la preparación de plásmidos, a partir de las colonias cultivadas en las placas y examen mediante digestión de nucleasa.

El procedimiento para construir vectores recombinantes, puede realizarse en concordancia con técnicas estándar que son conocidas en el arte especializado de la técnica. En la presente invención, se procede a emplazar el pdxP en pKK223-3, bajo el control del promotor ptac, para construir el pKKpdxP, con un vector de expresión en *E. coli*. En otra forma de presentación, el pdxP, se emplaza en el pVK100, bajo el control del promotor ptac, para construir el pVKptacpdxP, como un vector de expresión en *S. meliloti*.

Polipéptidos

La presente invención, proporciona también polipéptidos que tienen actividad VB6P-fosfatasa, y derivados funcionales de los polipéptidos. Tales tipos de derivados funcionales, se definen en base a las secuencias de aminoácidos de la presente invención, mediante adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de tales tipos de secuencias, en donde, tales tipos de derivados, tienen todavía actividad VB6P-fosfatasa. Tales tipos de derivados funcionales, pueden realizarse, bien ya sea mediante síntesis química de péptidos, la cual es conocida en el arte especializado de la técnica, o mediante medios recombinantes en base a la secuencia de DNA, tal y como se da a conocer aquí, en este documento, mediante procedimientos conocidos en el estado actual del arte especializado de la técnica. Los cambios de aminoácidos, en proteínas y péptidos, que no alteran de una forma general la actividad de tales tipos de moléculas, son conocidos, en el estado actual del arte especializado de la técnica. Los cambios que acontecen más comúnmente, son: Ala/Ser, Val/Ile, Aps/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, así como éstos de forma inversa.

Adicionalmente, además, los polipéptidos descritos aquí, en este documento, incluyen un polipéptido en concordancia con la SEQ ID NO:10, de una forma particular, aquéllos con la actividad biológica de VB6P-fosfatasa, y también, aquéllos que son por lo menos un 70% idénticos, de una forma preferible, por lo menos un 80% idénticos, y de una forma particularmente preferible, más de un 90% idénticos, al polipéptido en concordancia con la SEQ ID NO:10, y tienen la actividad mencionada.

Producción de vitamina B₆, a partir de VB6P

Los microorganismos recombinantes obtenidos en la presente invención, pueden incubarse en un medio que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno digestible, una sal orgánica, y otros nutrientes necesarios para su crecimiento o cultivo. Como fuente de carbono, puede emplearse, por ejemplo, glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa, sucrosa, almidón, dextrina, o glicerol. Como fuente de nitrógeno, puede emplearse, por ejemplo, peptona, licor impregnado de maíz, judía de soja en polvo, extracto de levaduras, extracto de carnes, cloruro amónico, sulfato amónico, nitrato amónico, urea, o mezclas de éstos. Adicionalmente, además, pueden utilizarse elementos de traza (oligoelementos), sulfatos, hidroccloruros (clorhidratos), o fosfatos de calcio, magnesio, zinc, manganeso, cobalto, y hierro. Y, en caso necesario, pueden también añadirse factores nutritivos convencionales, un agente de captura del ión fosfato, o un agente antiespumante, tal como carbonato de magnesio, óxido de aluminio, alófana, aceite animal, aceite vegetal o aceite mineral, de una forma suplementaria, en un medio de fermentación. El pH del cultivo, puede ser el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,0. La temperatura de cultivo, puede ser la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 45°C. El tiempo de cultivo, puede ser el correspondiente a un período que va desde aproximadamente un día hasta aproximadamente 15 días. En el proceso de cultivo, la aireación y la agitación, proporcionan, usualmente, unos resultados favorables.

La proteína que tiene actividad VB6P-fosfatasa, puede utilizarse en forma del cultivo, en sí mismo, el cual se ha preparado de la forma anteriormente descrita, arriba, un extracto exento de células (CFE) procedente del cultivo, proteína aislada del CFE, o una enzima inmovilizada, para preparar vitamina B₆, a partir de VB6P. La expresión del pdxP incorporado en el plásmido, en células huésped apropiadas, puede analizarse, para preparar el CFE, a partir del cultivo de microorganismos recombinantes, y sometiénola a electroforesis de gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE). La producción enzimática para preparar vitamina B₆, a partir de VB6P, puede realizarse procediendo a poner en contacto la proteína enzimáticamente activa, con VB6P, en un medio acuoso. El medio acuoso, puede ser una solución acuosa, la cual, en caso necesario, se puede tamponar. La VB6P, se disuelve en agua, y se añade al medio acuoso. La producción de vitamina B₆, a partir de VB6P, puede realizarse en el medio acuoso, con un valor pH comprendido dentro de unos márgenes de 5,5-9,0, de una forma preferible, con un valor pH comprendido dentro de unos márgenes de 7,0 - 8,0, y en unos márgenes de temperatura que van de 15°C a 45°C, de una forma preferible, de 30°C a 40°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a 5 horas, en presencia de Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Sn²⁺ ó Ni²⁺.

Después de la producción de vitamina B₆ a partir de VB6P, la vitamina B₆ producida, puede separarse de la mezcla de reacción y purificarse. Para este propósito, puede aplicarse un procedimiento generalmente utilizado para extraer un cierto producto de la mezcla de reacción, utilizando varias propiedades de la vitamina B₆. Así, por ejemplo, las proteínas, pueden desnaturalizarse procediendo a calentar o añadiendo un desnaturalizante, tal como el metanol o el etanol, y retirarse de la mezcla de reacción, mediante filtrado. La sustancia deseada, en el filtrado, puede absorberse sobre carbón activo, y después, eluirse y purificarse adicionalmente, con una resina intercambiadora de iones. De una forma alternativa, el filtrado, puede aplicarse directamente a una resina intercambiadora de iones y, después de la elución, el producto deseado, puede recristalizarse a partir de una mezcla de alcohol y de agua. La cantidad de vitamina B₆ producida en la mezcla de reacción, puede cuantificarse mediante HPLC.

La presente invención, se explicará ahora, en mayor detalle, haciendo referencia a los ejemplos que se facilitan a continuación

Procedimientos generales

Se procedió a utilizar *S. meliloti* IFO 14782, como una fuente de DNA cromosómico para experimentos de clonación de genes, y como una cepa huésped, para la producción de vitamina B₆, a partir de VB6P, mediante transconjugantes. Los derivados de *E. coli* K-12, se utilizaron también como una cepa huésped para experimentos de clonación molecular y para la producción de vitamina B₆, a partir de VB6P. Se cultivaron cepas de *E. coli* en medio LB (al cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como LB), consistentes en 1% Bacto Tryptone (Becton Dickinson Microbiology Systems, MD, USA), 0,5% extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson Microbiology Systems, MD, USA), y 0,5% NaCl, y se cultivaron cepas de *S. meliloti* en LB suplementado con 0,061% MgSO₄·7H₂O y 0,036% CaCl₂·2H₂O (al cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como LBMC). Se procedió añadir agar Bacto (1,5%), al medio, para preparar placas de agar. Se aisló DNA plásmido a partir de *E. coli* o de *S. meliloti*, con un equipo a modo de "kit", del tipo "QIAGEN Midi kit (QIAGEN GmbH, Alemania) o sistema automático de aislamiento de DNA del tipo "Automatic DNA Isolation System PI-50 (Kurabo Industry, Ltd., Japón). Se aisló DNA cromosómico, utilizando puntas genómicas del tipo "QIAGEN genomic-tips".

Las enzimas de restricción, la fosfatasa alcalina, el kit de ligado, las células competentes de *E. coli* JM109 y HB101 (Takara Bio. Inc. Shiga, Japón), y el equipo de clonación a modo de kit "TOPO TA cloning kit" (Invitrogen Japan K.K., Japón), se utilizaron en concordancia con las instrucciones del fabricante. El plásmido pKK223-3, se compró en el mercado, de procedencia de la firma Amersham Biosciences Corp. Para el análisis de las enzimas de restricción, los fragmentos de DNA, se fraccionaron en gel de azarosa, y se aislaron a partir de geles, por mediación de extracción, utilizando un sistema comercialmente obtenible en el mercado, con QIAEXII (QIAGEN GmbH). La secuencia de DNA, se determinó con un secuenciador de DNA del tipo "ALF DNA sequencer" (Amersham Biosciences).

Ejemplo 1

Clonación del gen de VB6P fosfatasa

1) Preparación de DNA cromosómico de *S. meliloti* IFO 14782

Se procedió a cultivar *S. meliloti* IFO 14782, en LBMC, a una temperatura de 30°C, durante un transcurso de tiempo de 16 horas. Las células, se recolectaron mediante centrifugación y, el DNA cromosómico, se aisló utilizando puntas de QIAGEN genómicas.

2) Adquisición de un fragmento parcial del gen de VB6P-fosfatasa

Con objeto de diseñar cebadores de PCR para clonar el gen de VB6P-fosfatasa, utilizando un procedimiento de PCR degenerada, se procedió a determinar secuencias de aminoácidos de péptidos N-terminales e internos, mediante la utilización de un secuenciador de proteínas, dando como resultado los péptidos Fr60 (SEQ ID NO:1), Fr64 (SEQ ID NO:2), Fr70 (SEQ ID NO:3), y N-terminal (SEQ ID NO:4).

El DNA que codifica a la VB6P fosfatasa de *S. meliloti*, se obtuvo mediante el procedimiento de PCR degenerada. Como cebador delantero, se utilizó CN02 (SEQ ID NO:5), correspondiente a la secuencia de aminoácidos N-terminal de la VB6P-fosfatasa de *S. meliloti* (SEQ ID NO:4). Como cebador inverso, se utilizó C642 (SEQ ID NO:6), correspondiente a la secuencia de aminoácidos interna de la VB6P-fosfatasa de *S. meliloti* (SEQ ID NO:2).

Se utilizó PCR, en concordancia con el protocolo de Takara Shuzo. Se utilizó DNA cromosómico (0,1 µg) de *S. meliloti* IFO 14782, como molde y se utilizó la ExTaq polimerasa como PCR-polimerasa. La condición de la PCR, era de la forma que sigue: 5 minutos a una temperatura de 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a una temperatura de 94°C, 30 segundos a una temperatura de 50°C, 30 segundos a una temperatura de 72°C, 7 minutos a una temperatura de 72°C. Después de la reacción, se procedió a analizar un alícuoto, mediante electroforesis en gel de azarosa, en 1,5% (peso/volumen) de geles y se purificaron productos de aproximadamente 0,5-kb, utilizando QIAEXII, y se clonaron en pCR2,1 TOPO. Se procedió a realizar la secuenciación de DNA de tres clones independientes que tenían insertos esperados, y se confirmó el hecho de que, las secuencias de DNA del fragmento del inserto de los tres clones, eran casi idénticas y que, las secuencias de aminoácidos deducidas, obtenidas de las secuencias de DNA, contenían la totalidad de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4. Uno de los clones, el phoC28, se utilizó para el siguiente estudio. A continuación, los cebadores C101 de PCR (cebador de sentido) (SEQ ID NO:7) y C101 (cebador antisentido), (SEQ ID NO:8), se sintetizaron en base a la secuencia de DNA del fragmento insertado de la phoC28, para obtener un fragmento parcial del gen de VB6P-fosfatasa, mediante PCR.

La condición de PCR, era de la forma que sigue: 5 minutos a una temperatura de 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a una temperatura de 94°C, 30 segundos a una temperatura de 55°C, 30 segundos a una temperatura de 72°C, 7 minutos a una temperatura de 72°C. Se utilizaron DNA cromosómico (0,1 µg) de *S. meliloti* IFO 14782 y ExTaq polimerasa, como molde, y PCR-polimerasa, respectivamente. Se amplificaron productos de aproximadamente 0,5-kb, mediante PCR, como se esperaba y, los productos, se clonaron en pCR2.1 TOPO. Como resultado del análisis de secuenciación de DNA, se confirmó la obtención de algunos clones, los cuales tenían secuencias idénticas con pho C28. Uno de los

clones, pC1, se utilizó para el siguiente test de ensayo, el cual tenía un fragmento parcial del gen de VB6P-fosfatasa de *S. meliloti* IFO 14782.

(3) *Análisis de hibridación Southern de digestores cromosómicos de S. meliloti*

Se procedió a marcar fragmentos de EcoR I de pC1, de 0,5-kb, con DIG-11-dUTP, mediante la utilización de un equipo de marcaje de DIG-DNA, del tipo "DIG-DNA labeling kit", y se utilizaron como sonda, para análisis de hibridación de Southern, para determinar una enzima de restricción apropiada, para utilizarla para construir una biblioteca genómica. El análisis de hibridación de Southern, se realizó en concordancia con el siguiente protocolo. El DNA cromosómico (3,4 μ g), se digirió con enzimas de restricción, y se sometió a electroforesis de gel de agarosa en 0,8% (peso/volumen) de geles. El DNA, se transfirió a la membrana de nylon en 10 x SSC, mediante la utilización de un absorbente de vacío del tipo "Vacum Blotter (modelo 785 - Bio-Rad)". La membrana, se pre-hibridó, en un tampón de hibridación [50% formamida, 5 x SSC, 2% reactivo de bloqueo, 0,1% N-lauroilsarcosina, y 0,3% SDS], durante un transcurso de tiempo de 6 horas y, después de la adición de la sonda desnaturalizada, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 42°C. El producto de absorción (blot), se lavó dos veces en 2 x SSC, que contenía 0,1% DSC, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a la temperatura ambiente, y dos veces en 0,1 x SSC que contenía 0,1% SDS, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 68°C. Los fragmentos de DNA, los cuales hibridaron a la sonda, se detectaron mediante la utilización de un equipo a modo de kit de detección DIG. Como resultado de ello, la sonda, hibridó a fragmentos de DNA de Sal I de 2,3-kb, de Eco R I de 3,5-kb, y de Kpn de 7,0-kb, en análisis de hibridación de Southern de digestores cromosómicos de *S. meliloti*.

(4) *Construcción de una biblioteca genómica de S. meliloti IFO 14782*

Se procedió a digerir parcialmente el DNA cromosómico, con EcoR I, sometido a electroforesis de gel de agarosa. Los fragmentos de DNA de 15- a 30-kb, se recuperaron a partir de geles, y se ligaron en pVK100, el cual se digirió con EcoR I, y se desfosforilizó con fosfatasa alcalina bacteriana. La mezcla de ligado, se utilizó para la reacción de envasado *in vitro* y, las partículas de fago, se utilizaron para infectar células de *E. coli* 8767, en la fase log. del crecimiento. La suspensión celular, se colocó sobre placa de LB, que contenía 10 μ g/ml de tetraciclina (a la cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como Tc). Se obtuvieron las colonias resistentes a Tc, y se almacenaron como biblioteca genómica de *S. meliloti* IFO 14782.

(5) *Rastreo de la biblioteca genómica de S. meliloti IFO 14782*

Con objeto de rastrear las colonias del gen de VB6P-fosfatasa de *S. melilote*, procedente de la biblioteca preparada en el ejemplo 1-(4), las colonias cultivadas en la placa de LB, con 10 μ g/ml de Tc, se transfirieron a la membrana de transferencia de nylon (Hybond® - N⁺ Amersham Pharmacia Biotech) y se sometieron a hibridación de colonias, con la sonda preparada en el ejemplo 1-(3). Entre los 3000 clones de la biblioteca genómica de *S. melilote* IFO 14782, se obtuvieron siete colonias positivas. Se prepararon plásmidos, mediante la utilización de puntas del tipo "QIAGEN-midi tip", a partir de colonias positivas, y se digirieron con enzimas de restricción, EcoR I y Sal I. Los plásmidos digeridos, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa en 1,0% (peso/volumen) de geles y se realizó un análisis de hibridación de Southern, tal y como se ha descrito en el ejemplo 1-(3), y se confirmó el hecho de que, la sonda, se hibridó a fragmentos de 2,3-kb de Sal I y 2,5-kb de EcoR I, de plásmidos digeridos. Uno de los plásmidos de las colonias positivas, el cual tenía un fragmento de EcoR I de 24-kb, se denominó pVECI.

Ejemplo 2

Expresión de pdxP y producción de vitamina B₆, a partir de VB6P

(1) *Expresión de pdx en E. coli*

Con objeto de expresar el gen de pdxP, bajo el control del promotor tac, en *E. coli*, se construyó el plásmido pKKpdxP. El gen del pdxP, se amplificó a partir de 100 ng de DNA cromosómico de *S. meliloti* IFO 14782, mediante un equipo avanzado de PCR, a modo de kit, del tipo "advantage-HF PCR kit" (Clontech, Estados Unidos de América), utilizando 10-pmol de los cebadores, Cebador P101 (SEQ ID NO.11) y Cebador P102 (SEQ ID NO.12).

Las condiciones de reacción, eran de la forma que sigue: después de mantener 15 segundos, a una temperatura de 94°C, 30 ciclos de 15 segundos a una temperatura de 94°C, 4 minutos a una temperatura de 68°C. La mezcla de reacción, se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento de DNA de 0,86-kb, de los geles, con QIAEXII. El fragmento de 0,86-kb obtenido, se clonó con un vector pCRII-TOPO, mediante un equipo de clonación, a modo de kit, del tipo "TOPOTA cloning kit" y, los 5 candidatos independientes obtenidos, se examinaron para las secuencia de DNA del fragmento de inserto. Como resultado de ello, unos de los candidatos, TOPpdxP105, el cual tenía una secuencia de inserto exacta, se utilizó para estudios adicionales.

El fragmento de Sma I de 0,86-kb, procedente del TOPOpdxP105, se ligó en el sitio Sma I de pKK233-3, en una orientación que permitía la transcripción de pdxP a partir del promotor tac, y el plásmido resultante, se denominó pKKpdxP (figura 2).

Los dos clones independientes JM109 que tenían el pKKpdxP (a saber, JM109/pKKpdxP-1 y JM109/pKKpdxP-7), se cultivaron en LB, con 100 µg/ml de ampicilina (Amp) y 1 mg/ml de piridoxamina. Después de un tiempo de cultivo de 1,5 horas, se indujo la expresión de pdxP, mediante la adición de 1 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranos (IPTG). Después del cultivo durante un transcurso de tiempo adicional de otras 4,5 horas, las células, se recolectaron y se suspendieron en un tampón 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, el cual contenía 15% sucrosa, 1 mM ditioneitol (DDT), 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, y 0,1 mM fenilmetilsulfonilo fluoruro (PMSF). La suspensión de las células, se sometió a un prensado en prensa French, a una presión de 800 kg/cm² y, el lisado resultante, se centrifugó a 35.000 x g, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a una temperatura de 4°C, con objeto de retirar los fragmentos de las células. El sobrenadante, se utilizó como CFE, después de diálisis con el mismo tampón. Con objeto de confirmar la expresión de PdxP, el CFE, se sometió a SDS-PAGE en 12,5% (peso/volumen) de geles, y se marcó con Cromassie Brilliant Blue (equipo a modo de kit del tipo Rapad Satín CBB Kit, Nacalai Teske, Japón). Se detectó la sobreproducción de polipéptidos, con el tamaño molecular esperado (29,0 kDa), en el *E. coli* JM 109/pKKpdxP-1, pero no en el *E. coli* JM 109/pKKpdxP-7. A continuación, el CFE de *E. coli* JM 109/pKKpdxP-1, se utilizó para estudios adicionales.

(2) Producción de vitamina B₆, a partir de VB6P en CFE de *E. coli* recombinante

La producción de vitamina B₆, a partir de VB6P, se realizó mediante la utilización del CFE preparado en el Ejemplo 2-(1). La mezcla de reacción, contenía un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM piridoxol 5'-fosfato (PNP), 1 mM MnCl₂ y CFE (0,5 mg proteína) en 125 µl. La reacción, se realizó a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos y, la cantidad de PN, se cuantificó mediante HPLC, mediante el procedimiento interno standard, con 4'-desoxipiridoxol, tal y como se describe abajo, a continuación. Para preparar las muestras para HPLC, se procedió a añadir 200 µl de 100 mg/l de 4'-desoxipiridoxol como sustancia interna, 50 µl de ácido perclórico al 60%, y 950 µl de agua desionizada, a 50 µl de la solución standard de piridoxol o la mezcla de reacción y, a continuación, la mezcla, se colocó sobre el hielo, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 15.000 rpm y, el sobrenadante, se puso en la siguiente columna. Las condiciones analíticas, eran según la forma que sigue: columna: carga del tipo "Capcell pak C18 SF120 (4,6 x 250 mm)" (Shiseido Co., Ltd., Tokio, Japón); fase móvil: 0,1 M perclorato sódico, 0,1 M fosfato potásico, y 2% acetónitrilo (pH 3,5); temperatura de la columna: 30°C; caudal, 1,0 ml/minuto; y detector: ultravioleta (a 292 nm). Los resultados obtenidos, se muestran en la tabla 5 que se facilita a continuación. La concentración del PN formado, en la mezcla de reacción que contenía CFE de JM109/pKKpdxP, era de 50 mM, y era 1,4 veces mayor que el de JM109/pKK223-3 (0,37 mM).

TABLA 5

Cantidad de PN formado en CFE de JM109/pKKpdxP

CFE	PN formado	
	(mM)	(factor de relación)
JM109/pKK223-3 (vector)	0,37	1
JM109/pKKpdxP	0,50	1,4
CFE negativo	ND	ND

ND : no detectable

(3) Expresión del pdxP en *S. meliloti*

El cósmido movilizable pVK100, se digirió con Bgl II, y a continuación, se recuperaron fragmentos de 21,3-kb. Después de que los fragmentos de trataran con fosfatasa alcalina bacteriana, se ligaron fragmentos de BamH I, de 1,1-kb, procedentes de pKKpdxP, en el fragmento de Bgl II digerido y desfosforilizado, para proporcionar un plásmido pVKPtacpdxP (Figura 3). A continuación, se obtuvo la *S. meliloti* IFO 14782 que tenía el pVKPtacpdxP, mediante conjugación tri-parental y, las células, se cultivaron en el medio de sembrado, que contenía 1% glucosa, 0,5% polipeptona, 0,2% extracto de levadura Bacto, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,001% MnSO₄·5H₂O, y 0,001% FeSO₄·7H₂O, y el cultivo de siembra, se transfirió a un medio de glucosa-polipeptona, el cual contenía 4% glucosa, 2% polipeptona, 0,2% extracto de levadura Bacto, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,05% MnSO₄·5H₂O, y 0,001% FeSO₄·7H₂O, y se cultivó a una temperatura de 20°C, durante un transcurso de tiempo de 3 días. Las células, se recolectaron mediante centrifugación, y se lavaron con solución salina, y se suspendieron con 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, tampón que contenía 15% sucrosa, 1 mM DDT, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, y 0,1 mM PMSF.

ES 2 297 228 T3

(2) Producción de vitamina B₆, a partir de VB6P mediante CFE de *S. meliloti* recombinante

La producción de vitamina B₆, a partir de VB6P, se examinó mediante la utilización del CFE preparado en el Ejemplo 2-(3). La mezcla de reacción, contenía un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM PNP, 1 mM MnCl₂ y CFE (0,4 mg proteína) en 125 µl. La reacción, se realizó a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos y, la cantidad de PN, se cuantificó mediante HPLC, tal y como se muestra en el Ejemplo 2-(2). Los resultados obtenidos, se muestran en la tabla 6 que se facilita a continuación. La concentración del PN formado, en la mezcla de reacción que contenía CFE de *S. meliloti* IFO 14782/pVKPtacpdxP, era de 166 mM, y era 4 veces mayor que la *S. meliloti* IFO 14782 (0,41 mM).

TABLA 6

Cantidad de PN formado en CFE de JM109/pKKpdxP

CFE	PN formado	
	(mM)	(factor de relación)
<i>S. meliloti</i> IFO 14782	0,41	1
<i>S. meliloti</i> IFO 14782 / pVKPtacpdxP	1,66	4,0
CFE negativo	ND	ND

ND : no detectable

REIVINDICACIONES

1. Un DNA aislado, que codifica para la vitamina B₆-fosfato-fosfatasa, seleccionado de entre el grupo consistente en:

(a) una secuencia de DNA representada en la SEQ ID NO:9;

(b) una secuencia de DNA que codifica un polipéptido que tiene actividad B₆-fosfato-fosfatasa y que hibrida bajo condiciones standard a la secuencia de DNA definida en (a) o un fragmento de ésta, y que es por lo menos un 70% idéntica a la secuencia de DNA de la SEQ ID NO:9 ó un fragmento de ésta;

(c) una secuencia de DNA que codifica un polipéptido que tiene actividad B₆-fosfato-fosfatasa, en donde, excitado polipéptido, es por lo menos un 70% idéntica a la secuencia de DNA de la SEQ ID NO:10;

(d) una secuencia de DNA que codifica un polipéptido que tiene actividad B₆-fosfato-fosfatasa, en donde, excitado polipéptido, es por lo menos un 70% idéntica a la secuencia de DNA de la SEQ ID NO:9;

(e) una secuencia de DNA degenerado, de una cualquiera de (a) a (c).

2. Un vector o plásmido que comprende el DNA aislado de la reivindicación 1.

3. Un microorganismo recombinante del género Sinorhizobium o Escherichia, capaz de producir vitamina B₆ a partir de B₆-fosfato, en donde, el citado organismo, se transforma con el DNA de la reivindicación 1 ó el vector o plásmido de la reivindicación 2.

4. Un procedimiento para preparar extracto exento de células, que tiene actividad B₆-fosfato-fosfatasa, el cual comprende el cultivar el microorganismo según la reivindicación 3, en donde, el microorganismo, se cultiva bajo unas condiciones en un medio que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno digestible, sales inorgánicas, y otros nutrientes necesarios para el crecimiento o cultivo del microorganismo, a un valor pH comprendido dentro de unos márgenes que van de 5,0 a 9,0 y a una temperatura de comprendida dentro de unos márgenes que van de 5°C a 45°C, y durante un transcurso de tiempo de 1 día a 15 días, bajo condiciones aeróbicas, y romper células del microorganismo.

5. El procedimiento, para producir vitamina B₆, a partir de B₆-fosfato, el cual comprende el poner en contacto vitamina B₆-fosfato, con el extracto exento de células del microorganismo según la reivindicación 3, en una mezcla de reacción, y recuperar la vitamina B₆ resultante de la mezcla de reacción.

Fig. 1

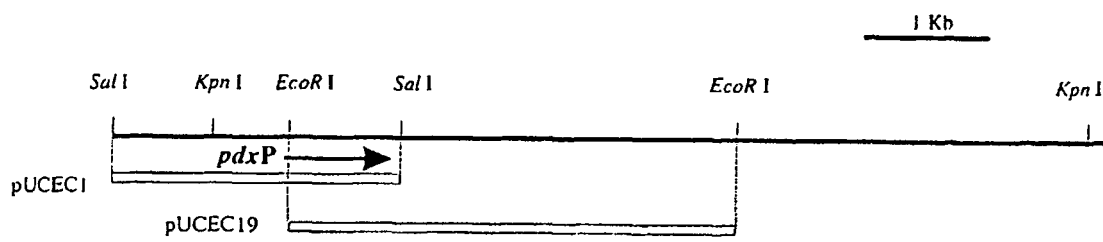


Fig. 2

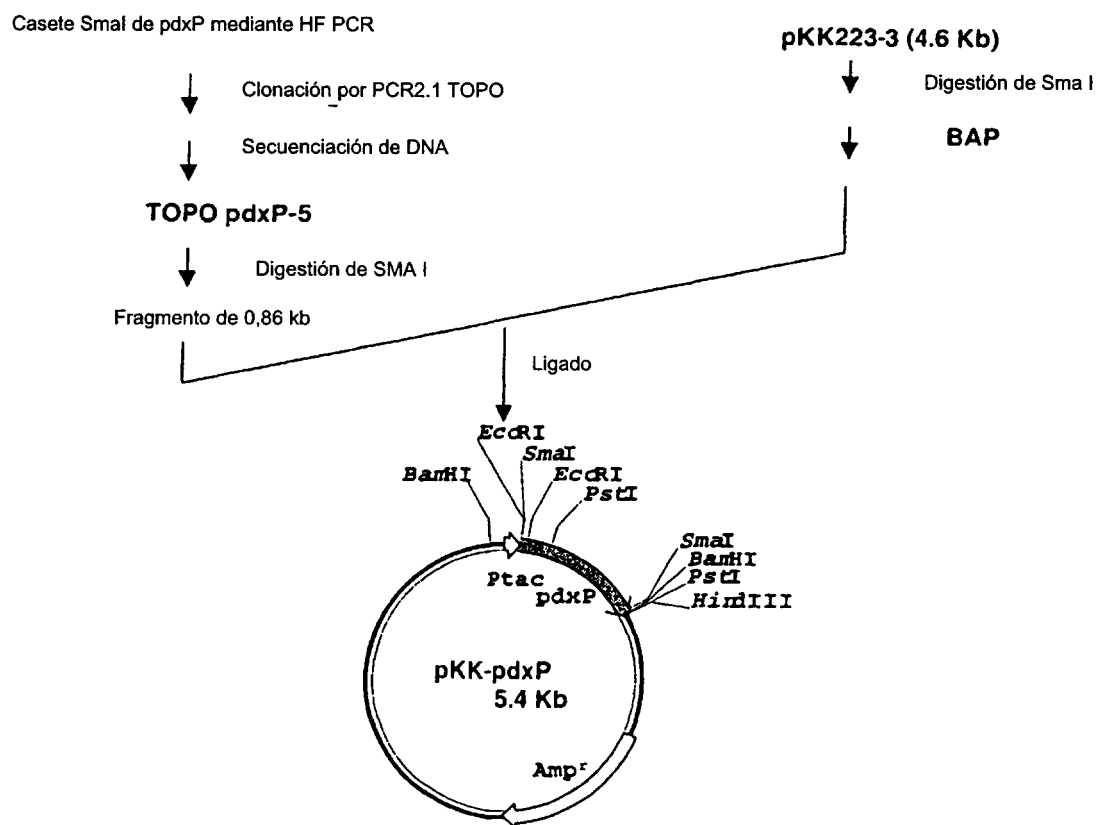
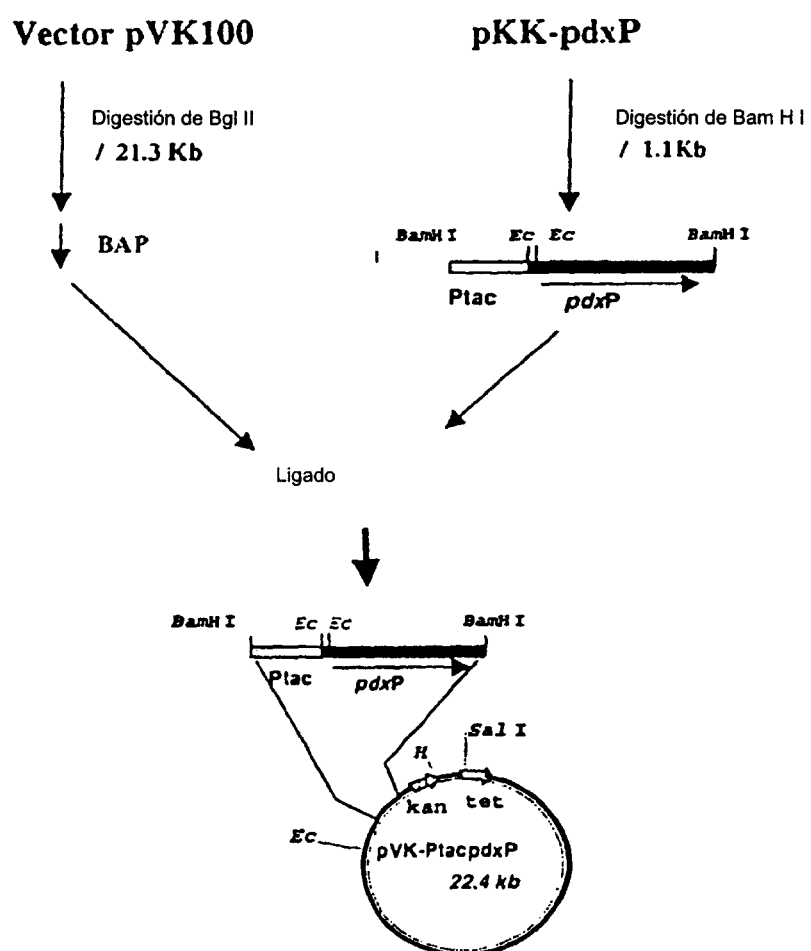


Fig. 3



ES 2 297 228 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Vitamins AG
 5 <120> Un gen que codifica para la vitamina B₆-fosfato-fosfatasa y su uso
 <130> NDR5234
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.1
 10 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> *sinorhizobium meliloti*

 <400> 1
 20 Ala His Ala Ile Asp Tyr Ser Val Val Pro Ala Asp Pro Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ile Lys
 20
 25 <210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> secuencia artificial

 <400> 2
 35 Ile Asp Thr Ala Asn Ala Val Met Phe Glu Asp Leu Pro Arg
 1 5 10

 <210> 3
 40 <211> 23
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <400> 3
 45 Asp His Gly Thr Thr Leu Gln Gly Leu Met Leu His His Gly Ile Asp
 1 5 10 15
 Pro Asn Asp Phe Leu Glu Arg
 20
 50

 <210> 4
 <211> 10
 55 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <400> 4
 60 Met Lys Lys Leu Asp Arg Met Pro Thr His
 1 5 10

 65 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA

ES 2 297 228 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<221> características diversas	
	<222> (18).418)	
	<223> n es inosina	
10	<220>	
	<221> características diversas	
	<222> (12)..(12)	
	<223> n es inosina	
15	<400> 5	
20	atgaaraary tngaymgnat g	21
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
30	<221> características diversas	
	<222> (12)..(12)	
	<223>	
35	<220>	
	<221> características diversas	
	<222> (15)..(15)	
	<223> n es a, g, c, ó t	
40	<220>	
	<221> características diversas	
	<222> (12)412)	
45	<223> n es a, g, c, ó t	
	<400> 6	
50	tcytraaca tncangcrtt	20
	<210> 7	
	<211> 21	
55	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<400> 7	
60	gccgaattcg cccatgtcac c	21
	<210> 8	
65	<211> 21	
	<212> DNA	

ES 2 297 228 T3

<213> Artificial

<400> 8

5 cgccgtgtcg atgcggtgaa g

21

<210> 9

10 <211> 708

<212> DNA

<213> secuencia artificial

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)4(708)

<223>

20

<400> 9

25	atg aag aag ctc gac cgc atg ccg acc cac gcc gaa ttc gcc cat gtc Met Lys Lys Leu Asp Arg Met Pro Thr His Ala Glu Phe Ala His Val 1 5 10 15	48
	acc gac tgg gtc ttc gac ctc gac aac acg ctc tat ccg cat cac gtc Thr Asp Trp Val Phe Asp Leu Asp Asn Thr Leu Tyr Pro His His Val 20 25 30	96
30	aat ctg ttc tca cag atc gac cgc aac atg acg gcc tat gtt gcc gaa Asn Leu Phe Ser Gln Ile Asp Arg Asn Met Thr Ala Tyr Val Ala Glu 35 40 45	144
35	ctc ctg tcg ctg gag cct gcg gag gcg aag aag ctg cag aag gaa tac Leu Leu Ser Leu Glu Pro Ala Glu Ala Lys Lys Leu Gln Lys Glu Tyr 50 55 60	192
40	tac cgc gac cac ggc acc acg ctt cag ggc ctg atg ctt cat cac ggc Tyr Arg Asp His Gly Thr Thr Leu Gln Gly Leu Met Leu His His Gly 65 70 75 80	240
	atc gat ccc aat gat ttc ctc gaa aga gcc cac gcc atc gac tat agc Ile Asp Pro Asn Asp Phe Leu Glu Arg Ala His Ala Ile Asp Tyr Ser 85 90 95	288
45	gtg gtg ccg gcc gat ccg gcg ctc ggc gag gcg atc aag gcg ctg ccc Val Val Pro Ala Asp Pro Ala Leu Gly Glu Ala Ile Lys Ala Leu Pro 100 105 110	336
50	gga cgc aag ttc atc ttc acc aac ggc agc gtc gcc cat gcg gag atg Gly Arg Lys Phe Ile Phe Thr Asn Gly Ser Val Ala His Ala Glu Met 115 120 125	384
	acc gcg cgg gcg ctc ggc att ctc gag cat ttc aac gac atc ttc gac Thr Ala Arg Ala Leu Gly Ile Leu Glu His Phe Asn Asp Ile Phe Asp 130 135 140	432
55	atc gtc gcc gcc ggc ttc ata ccg aag ccc gcc ggc gac acc tac gac Ile Val Ala Ala Gly Phe Ile Pro Lys Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Asp 145 150 155 160	480
60	aag ttc atg ggc ctt cac cgc atc gac acg gcg aat gag gtg atg ttc Lys Phe Met Gly Leu His Arg Ile Asp Thr Ala Asn Glu Val Met Phe 165 170 175	528
	gag gat ctg ccg cgc aac ctg gtc gtc cct aag gcg ctc ggc atg aag Glu Asp Leu Pro Arg Asn Leu Val Val Pro Lys Ala Leu Gly Met Lys 180 185 190	576
65	acg gtg ctg ctc gtg ccg cgc aat ctc gaa tac gag ttc gcc gag gcc	624

ES 2 297 228 T3

Thr Val Leu Leu Val Pro Arg Asn Leu Glu Tyr Glu Phe Ala Glu Ala
 195 200 205
 5 tgg gaa acg tcg agc gac gcg gac gat cag atc gac tac gtc acg gaa 672
 Trp Glu Thr Ser Ser Asp Ala Asp Asp Gln Ile Asp Tyr Val Thr Glu
 210 215 220
 gac ctg gcg ggt ttc ctg cgc agt gtg att gtt tag 708
 Asp Leu Ala Gly Phe Leu Arg Ser Val Ile Val
 225 230 235
 10
 <210> 10
 <211> 235
 15 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <400> 10
 20
 Met Lys Lys Leu Asp Arg Met Pro Thr His Ala Glu Phe Ala His Val
 1 5 10 15
 25 Thr Asp Trp Val Phe Asp Leu Asp Asn Thr Leu Tyr Pro His His Val
 20 25 30
 Asn Leu Phe Ser Gln Ile Asp Arg Asn Met Thr Ala Tyr Val Ala Glu
 35 40 45
 Leu Leu Ser Leu Glu Pro Ala Glu Ala Lys Lys Leu Gln Lys Glu Tyr
 50 55 60
 35 Tyr Arg Asp His Gly Thr Thr Leu Gln Gly Leu Met Leu His His Gly
 65 70 75 80
 40 Ile Asp Pro Asn Asp Phe Leu Glu Arg Ala His Ala Ile Asp Tyr Ser
 85 90 95
 Val Val Pro Ala Asp Pro Ala Leu Gly Glu Ala Ile Lys Ala Leu Pro
 100 105 110
 45 Gly Arg Lys Phe Ile Phe Thr Asn Gly Ser Val Ala His Ala Glu Met
 115 120 125
 50 Thr Ala Arg Ala Leu Gly Ile Leu Glu His Phe Asn Asp Ile Phe Asp
 130 135 140
 55 Ile Val Ala Ala Gly Phe Ile Pro Lys Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Asp
 145 150 155 160
 Lys Phe Met Gly Leu His Arg Ile Asp Thr Ala Asn Glu Val Met Phe
 165 170 175

ES 2 297 228 T3

Glu Asp Leu Pro Arg Asn Leu Val Val Pro Lys Ala Leu Gly Met Lys
 180 185 190
 5 Thr Val Leu Leu Val Pro Arg Asn Leu Glu Tyr Glu Phe Ala Glu Ala
 195 200 205
 10 Trp Glu Thr Ser Ser Asp Ala Asp Asp Gln Ile Asp Tyr Val Thr Glu
 210 215 220
 Asp Leu Ala Gly Phe Leu Arg Ser Val Ile Val
 225 230 235

15 <210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <400> 11

25 gaagcttccc gggccgtgtc ataaaccgcg cc

32

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <400> 12

35 caagcttccc gggatcatcg ccgggtttta cg

32

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP ASSETS B.V.
 45 <120> Un gen que codifica para la vitamina B6-fosfato-fosfatasa y su uso
 <130> NDR5234
 <140> PCT/EP03/10575
 50 <141> 2003-09-23
 <150> EP 02021622.2
 55 <151> 2002-09-27
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.2
 60 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 65 <213> secuencia artificial

ES 2 297 228 T3

<400> 1
 Ala His Ala Ile Asp Tyr Ser Val Val Pro Ala Asp Pro Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Ala Ile Lys
 20
 <210> 2
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15 <400> 2
 Ile Asp Thr Ala Asn Ala Val Met Phe Glu Asp Leu Pro Arg
 1 5 10
 20 <210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 25 <213> secuencia artificial
 <400> 3
 30 Asp His Gly Thr Thr Leu Gln Gly Leu Met Leu His His Gly Ile Asp
 1 5 10 15
 Pro Asn Asp Phe Leu Glu Arg
 20
 35 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> secuencia artificial
 <400> 4
 45 Met Lys Lys Leu Asp Arg Met Pro Thr His
 1 5 10
 <210> 5
 50 <211> 21
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador CNO2
 <220>
 60 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> 1
 65 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)

ES 2 297 228 T3

	<223> 1	
	<400> 5	
5	atgaaraary tagaymgaat g	21
	<210> 6	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador 0842	
	<220>	
20	<221> base modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> n as a, g, c, t	
25	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (15)..(15)	
30	<223> n es a, g, c, ó t	
	<400> 6	
35	tcytcaaca tncangrtt	20
	<210> 7	
	<211> 21	
40	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador C101	
	<400> 7	
50	gccgaattcg cccatgtcac c	21
	<210> 8	
	<211> 21	
55	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador C102	
	<400> 8	
65	cgccgtgtcg atgcggtgaa g	21
	<210> 9	

ES 2 297 228 T3

<211> 708

<212> DNA

<213> secuencia artificial

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(708)

10

<400> 9

15	atg aag aag ctc gac cgc atg ccg acc cac gcc gaa ttc gcc cat gtc Met Lys Lys Leu Asp Arg Met Pro Thr His Ala Glu Phe Ala His Val	48
20	acc gac tgg gtc ttc gac ctc gac aac acg ctc tat ccg cat cac gtc Thr Asp Trp Val Phe Asp Leu Asp Asn Thr Leu Tyr Pro His Val	96
25	aat ctg ttc tca cag atc gac cgc aac atg acg gcc tat gtt gcc gaa Asn Leu Phe Ser Gln Ile Asp Arg Asn Met Thr Ala Tyr Val Ala Glu	144
30	ctc ctg tcg ctg gag cct gcg gag gcg aag aag ctg cag aag gaa tac Leu Leu Ser Leu Glu Pro Ala Glu Ala Lys Lys Leu Gln Lys Glu Tyr	192
35	tac cgc gac cac ggc acc acg ctt cag ggc ctg atg ctt cat cac ggc Tyr Arg Asp His Gly Thr Leu Gln Gly Leu Met Leu His His Gly	240
40	atc gat ccc aat gat ttc ctc gaa aga gcc cac gcc atc gac tat agc Ile Asp Pro Asn Asp Phe Leu Glu Arg Ala His Ala Ile Asp Tyr Ser	288
45	gtg gtg ccg gcc gat ccg gcg ctc ggc gag gcg atc aag gcg ctg ccc Val Val Pro Ala Asp Pro Ala Leu Gly Glu Ala Ile Lys Ala Leu Pro	336
50	gga cgc aag ttc atc ttc acc aac ggc agc gtc gcc cat gcg gag atg Gly Arg Lys Phe Ile Phe Thr Asn Gly Ser Val Ala His Ala Glu Met	384
55	acc gcg cgg gcg ctc ggc att ctc gag cat ttc aac gac atc ttc gac Thr Ala Arg Ala Leu Gly Ile Leu Glu His Phe Asn Asp Ile Phe Asp	432
60	atc gtc gcc gcc ggc ttc ata ccg aag ccc gcc ggc gac acc tac gac Ile Val Ala Ala Gly Phe Ile Pro Lys Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Asp	480
65	aag ttc atg ggc ctt cac cgc atc gac acg gcg aat gag gtg atg ttc Lys Phe Met Gly Leu His Arg Ile Asp Thr Ala Asn Glu Val Met Phe	528
70	gag gat ctg ccg cgc aac ctg gtc gtc cct aag gcg ctc ggc atg aag Glu Asp Leu Pro Arg Asn Leu Val Val Pro Lys Ala Leu Gly Met Lys	576
75	acg gtg ctg ctc gtg ccg cgc aat ctc gaa tac gag ttc gcc gag gcc Thr Val Leu Leu Val Pro Arg Asn Leu Glu Tyr Glu Phe Ala Glu Ala	624
80	tgg gaa acg tcg agc gac gcg gac gat cag atc gac tac gtc acg gaa Trp Glu Thr Ser Ser Asp Ala Asp Asp Gln Ile Asp Tyr Val Thr Glu	672
85	gac ctg gcg ggt ttc ctg cgc agt gtg att gtt tag Asp Leu Ala Gly Phe Leu Arg Ser Val Ile Val	708

<210> 10

<211> 235

ES 2 297 228 T3

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <400> 10

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

<210> 11

ES 2 297 228 T3

	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> alarmada artificial	
5	<220>	
	<223> cebador P101	
10	<400> 11	
	gaagcttccc gggccgtgtc ataaaccgc cc	32
15	<210> 12	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebadar P102	
25	<400> 12	
	caagcttccc gggatcatcg ccgggttta cg	32
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		