



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 531**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)	C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	C12P 17/18 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)	C12R 1/19 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01958584 .3**

96 Fecha de presentación : **28.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1314782**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2003**

54 Título: **Proceso para producir biopterinas.**

30 Prioridad: **31.08.2000 JP 2000-262973**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2009

73 Titular/es: **Asubio Pharma Co., Ltd.**
9-11 Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo, JP

72 Inventor/es: **Yabuta, Masayuki;**
Furukawa, Kazuaki;
Miyamoto, Nobue;
Yamamoto, Katsuhiko y
Ohsuye, Kazuhiro

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 320 531 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

Proceso para producir biopterinas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una célula transformada en la cual se introducen genes de dos o más enzimas que participan en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina y también a un proceso para la producción de un compuesto de biopterina que la utiliza.

10 **Antecedentes de la técnica**

En la presente memoria descriptiva, tetrahidrobiopterina (L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; de aquí en adelante denominada THBP), 7,8-dihidrobiopterina (L-eritro-7,8-dihidrobiopterina; de aquí en adelante denominada DHBP) o biopterina (de aquí en adelante denominada BP) o una combinación de dos o más cualesquiera de ellas se denomina un compuesto de biopterina, en conjunto.

La THBP es una biosustancia ampliamente distribuida en animales y, en 1963, Kaufman reveló que era una coenzima de la fenilalanina hidroxilasa en hígado de rata. Posteriormente, también se reveló que la THBP es una coenzima que comúnmente actúa sobre tirosina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa y que desempeña un papel importante al participar en la biosíntesis de neurotransmisores. En los últimos años también se descubrió su función como coenzima para la monóxido de nitrógeno (NO) sintasa y ha sido objeto de la atención pública como una coenzima para enzimas biosintéticas para distintas biosustancias. Se sabe que, en los seres humanos, una THBP defectuosa tiene como resultado una reducción de la actividad de la hidroxilasa de aminoácidos mencionada anteriormente, lo que origina una fenilcetonuria anormalmente alta y una fenilalaninuria anormalmente alta y la THBP se utiliza como terapia para dichas enfermedades de errores innatos del metabolismo como hidrocloruro de sapropterina.

Se sabe que, en animales, la THBP se biosintetiza a partir de la guanosina trifosfato (de aquí en adelante abreviada GTP) por una reacción enzimática de tres etapas que utiliza GTP ciclohidrolasa I (de aquí en adelante abreviada GCH), 6-piruviltetrahidropterina sintasa (de aquí en adelante abreviada PTPS) y sepiapterina reductasa (de aquí en adelante abreviada SPR), tal como se muestra en la Fig. 1. Por otro lado, aparte de los animales, se ha informado que la THBP se encuentra presente en la mosca de la fruta (Weisberg, E. P. y O'Donnell, J. M. *J. Biol. Chem.* 261:1453-1458, 1996), el gusano de seda (Iino, T., Sawada, H., Tsusue, M. y Takikawa, S.-I. *Biochim. Biophys. Acta* 1297:191-199, 1996), microbios eucariotas tales como *Euglena gracilis*, *Neurospora crassa* y *Pycomyces blakesleeana* (Maier, J., Ninnemann, H. *Photochemistry and Photobiology* 61:43-53, 1995) y especies *Nocardia* que son microbios procariotas (Son, J. K., Rosazza J. P. *J. Bacteriol.* 182:3644-3648, 2000). De este modo, si bien hay muchos seres vivos en los cuales se ha detectado la presencia de la THBP, los microbios particularmente difieren en gran medida de los animales dada su evolución y, por lo tanto, se cree que la THBP no es una biosustancia que se encuentre comúnmente disponible en los microbios.

La THBP es un compuesto que tiene tres carbonos asimétricos en una molécula y, por lo tanto, es un compuesto cuya síntesis química es difícil y, con respecto a sus métodos sintéticos principales, se conoce un método en el cual la L-eritro-biopterina (BP) se sintetiza mediante la utilización de ramnosa o desoxiarabinosa como material de partida y luego se somete químicamente a una reducción asimétrica para sintetizar el producto. Sin embargo, dichos métodos de síntesis química tienen muchas etapas de reacción y, durante las etapas de reacción, existen procesos que tienen bajos rendimientos de reacción. También existe la dificultad de que la ramnosa y la desoxiarabinosa, que son los materiales de partida, son costosas y los métodos de fabricación no son ventajosos en cuanto a procedimiento, rendimiento, costos, etc.

Dadas estas circunstancias, Kagamiyama, *et al.* intentaron la síntesis de la THBP mediante una reacción enzimática, purificaron cada una de las tres enzimas que participan en la síntesis de la THBP y, mediante la utilización de las tres enzimas, lograron con éxito sintetizar la THBP en un reactor que contenía GTP y nicotinamida dinucleótido fosfato (forma reducida) (de aquí en adelante abreviada NADPH) (Patente Japonesa abierta a inspección pública No. 82.888/1992). Sin embargo, para obtener 1 kg de THBP mediante este método se necesitan 3,12 kg de GTP y 92 kg de NADPH. El hecho de que dichos materiales son muy costosos y de que los procedimientos, incluida la purificación de tres tipos de enzimas, son muy engorrosos hace que la producción industrial del compuesto de biopterina mediante la utilización de dicho método sea difícil dados los costos y los procedimientos.

Por otro lado, Shiraishi, *et al.* encontraron que las enzimas del género *Candida* (*Candida novellus*, *Candida rugosa*, *Candida robusta*, etc.) y varios hongos filamentosos del género *Mucor* (*Mucor javanicus*, *Mucor alternans*, *Mucor subtilissimus*, etc.) acumulan L-eritro-biopterina (BP), que es un producto oxidado de la THBP, en un medio e informaron acerca de un proceso para la producción de BP a partir del medio de cultivo utilizando la propiedad mencionada (Patente Japonesa abierta a inspección pública No. 9.296/1986 y No. 33.990/1993). Dado que la BP es capaz de convertirse en THBP mediante una reducción química, un método en el que la BP sea producida por microbios y luego se convierta en THBP no necesita los costosos GTP y NADPH y, además, reduce sustancialmente las etapas de síntesis y, por lo tanto, es un método de fabricación industrialmente ventajoso en vista de los procedimientos. Sin embargo, en cualquiera de las cepas, la cantidad de BP producida de esta manera es tan baja que la producción de BP por litro de

medio de cultivo no es mayor que 1 mg y, por lo tanto, no es un método de fabricación industrialmente ventajoso en vista del rendimiento y los costos.

Anteriormente se han transfectado células huésped de fibroblasto humano con enzimas biosintéticas de THBP: Laufs, S. *et al.*, *Journal of Neurochemistry* 71(1):33-40, 1998 describen un proceso para la transfección de fibroblastos humanos de tipo salvaje y con deficiencia de PTPS con dos vectores retrovirales que expresan GTPCH y PTPS, respectivamente. Las células transfectadas producen tetrahidrobiopterina y ésta se mide en el sobrenadante de cultivo a través de su producto de oxidación, la biopterina. También se describen constructos de transfección de fibroblastos humanos similares en Laufs, S. *et al.*, *The Journal of Gene Medicine* 2(1):22-31, 2000; y Thöny, B., *et al.*, *Human Gene Therapy* 7(13):1587-1593, 1996.

La técnica anterior también describe la transfección de microorganismos con enzimas biosintéticas individuales: Thöny, B. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(3):1437-1443, 1992 describen la expresión de PTPS de hígado humano en *E. coli*. Babitzke, P., *et al.*, *Journal of Bacteriology* 174(7):2059-2064, 1992 describen la clonación de los genes *mtrA* y *mtrB* de *Bacillus subtilis*, en la que la expresión de *MtrA* en *E. coli* conduce a un aumento de la actividad de GCH. Mancini, R., *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255(2):521-527, 1999 describen la expresión de *E. coli* o GTPCH humana en un mutante *deltafol2* (GCH) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Por lo tanto, la THBP, que es útil como tal, raramente ha sido objeto de estudio porque no ha habido un método de fabricación industrialmente ventajoso y, además, su utilidad no siempre se ha aprovechado suficientemente porque la THBP raramente se ha proporcionado en general como productos farmacéuticos, etc. Más aun, si bien se ha esperado que los compuestos de biopterina, tales como DHBP y BP, que son productos oxidados de THBP y que se mencionarán más adelante, exhiban las mismas acciones farmacológicas, o incluso mejores, estas acciones no se han investigado cabalmente.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para una producción industrialmente ventajosa del compuesto de biopterina en grandes cantidades a partir de un material de partida menos costoso utilizando medios de ingeniería genética.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una célula transformada capaz de participar en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina en la que se introduce un gen de una o más enzimas o proporcionar un vector de expresión que tiene un gen de una o más enzimas capaz de participar en la biosíntesis de la tetrahidrobiopterina utilizada para la preparación de dicha célula transformada.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar una célula huésped mutante tal como una célula genéticamente recombinada que tiene una capacidad sintética de GTP que no sea menor que la capacidad sintética de GTP de células de tipo salvaje o proporcionar una célula huésped mutante o una célula transformada que tiene una actividad de GCH no menor que la actividad de GCH inherente a las células de tipo salvaje que es ventajosa para la producción de tetrahidrobiopterina.

Los inventores de la presente invención han encontrado que, cuando se introduce un gen de una enzima que participa en la biosíntesis de la THBP en células huésped de microbio o similar que pueden cultivarse en grandes cantidades, la presente sustancia puede biosintetizarse a un bajo costo y en grandes cantidades. Así, dado que la GTP, que es un material de partida para la biosíntesis de la THBP, es una sustancia comúnmente disponible en organismos vivos, se ha encontrado que, cuando los genes que codifican enzimas para la biosíntesis de la THBP en animales u otros organismos vivos se introducen en una célula huésped mediante una técnica de recombinación genética, la célula huésped que es inherentemente incapaz de producir THBP ahora es capaz de producir THBP, por lo que Los inventores de la presente invención han realizado una profunda investigación para la preparación de dichas células transformadas.

Sin embargo, por otro lado, existe la posibilidad de que la síntesis de THBP en grandes cantidades pueda ser dañina para la célula huésped y se prevé que la producción de THBP a través de este método también será difícil. Así, dado que la THBP tiene una estructura similar a la del ácido fólico debido a la presencia de un anillo de pteridina en ella, también puede considerársela como un tipo de análogo de ácido fólico. De hecho, existe un informe según el cual la reductasa de ácido dihidrofólico de *Escherichia coli* actúa en la 7,8-dihidroneopterina (DHBP), que es un producto oxidado de la THBP, con lo cual la DHBP se convierte en THBP (Watanabe, *et al.* *Seikagaku*, volumen 53, no. 8, p. 1008 (1981)). El ácido fólico es una coenzima que participa en distintas reacciones de transición de carbono *in vivo* y es una sustancia esencial para el crecimiento de las células y, por lo tanto, cuando la THBP se sintetiza en cantidades considerablemente grandes en células, se prevé que la reacción enzimática en la que participa el ácido fólico es inhibida y que se produce la inhibición del crecimiento de las células y su subsiguiente muerte.

También hay informes que indican que la 7,8-dihidroneopterina producida a partir de 7,8-dihidroneopterina trifosfato, que es un producto intermedio para la síntesis de THBP, forma un radical (Oettl, K., *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:262-7, 1999) y que, cuando la neopterina, que es un producto oxidado de la misma, se encuentra presente junto con peróxido de hidrógeno o ácido nitroso, la citotoxicidad del peróxido de hidrógeno y del ácido nitroso se potencia aun más (Wede, I., *et al.* *Free Radic. Res.* 1999 Nov;31(5):381-8). Por lo tanto, cuando la THBP se

produce en grandes cantidades, la 7,8-dihidroneopterina trifosfato como producto intermedio se acumula y la fosfatasa en las células la convierte en 7,8-dihidroneopterina, con lo cual existe la posibilidad de dañar a las células debido a la formación de radicales o existe la posibilidad de que se produzca una citotoxicidad debido a la coexistencia de neopterina, que se produce por la oxidación con peróxido de hidrógeno y ácido nitroso generados en las células.

Además, existe el riesgo de que la síntesis de THBP en grandes cantidades pueda reducir la acumulación de GTP que es un sustrato y de NADPH que es una coenzima en las células, con lo cual puede producirse la inhibición del crecimiento. Asimismo, existe el riesgo de que, cuando una enzima que es necesaria para la biosíntesis de la THBP se expresa considerablemente en las células, se pueda producir la inhibición del crecimiento celular. Más aun, no se sabe con certeza si la THBP considerablemente producida en las células se transfiere con seguridad a un medio de forma eficiente.

Tomando en cuenta dicha toxicidad hacia las células huésped, los inventores de la presente invención introdujeron el gen de la enzima que participa en la síntesis de THBP en *Escherichia coli* y levadura *Saccharomyces*, que intrínsecamente no poseen dicha capacidad de realizar la síntesis, e investigaron la productividad del compuesto de biopterina. Como resultado, encontraron que las células transformadas preparadas de esta forma no causaron la inhibición del crecimiento que les preocupaba, sino que produjeron compuesto de biopterina en grandes cantidades y fueron capaces de transferir eficientemente dicho compuesto de biopterina al medio de cultivo. Como resultado de invenciones adicionales, se encontró que era posible la producción del compuesto de biopterina por parte de células transformadas en las que se introduce gen de enzima que participa en la síntesis de THBP.

Los inventores de la presente invención también realizaron investigaciones para aumentar la producción del compuesto de biopterina en las que se usó *Escherichia coli* como ejemplo. Para comenzar, dado que la sustancia de partida para la síntesis de THBP es GTP, se investigó la preparación de células huésped que tenían una alta capacidad de sintetizar GTP, ni menor ni mayor que la de las células de tipo salvaje (de aquí en adelante denominadas células huésped altamente sintetizadoras de GTP).

Se encontró que, dado que la GTP es un tipo de compuesto de purina, las células huésped que tenían mutación para una síntesis de GTP mejorada podían obtenerse cuando se detectaba sistemáticamente una cepa mutante con vía de biosíntesis de purina desregulada. Existe un informe que indica que, en el caso de *Bacillus subtilis*, dicha cepa mutante reguladora para la síntesis de purina puede obtenerse a partir de mutantes que presentan una resistencia a análogos de purina, tal como 8-azaguanina y decoinina (remitirse, por ejemplo, Ishii y Shiio, *Agric. Biol. Chem.* 36(9):1511-1522, 1972; Matsui, *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 43(8):1739-1744, 1979), aunque, en el caso de *Escherichia coli*, no queda claro si dichos análogos de purina son eficaces para la recolección de células huésped altamente sintetizadoras de GTP.

Los inventores de la presente invención obtuvieron con éxito células altamente sintetizadoras de GTP mediante la utilización de análogos de purina tales como 8-azaguanina y decoinina, aun en el caso de *Escherichia coli*. Los inventores de la presente invención también descubrieron el hecho sorprendente de que, cuando dicha cepa mutante reguladora para la síntesis de purina en donde la capacidad sintética de GTP está potenciada se utilizaba como célula huésped, la productividad del compuesto de biopterina era aproximadamente diez veces superior en comparación con el caso en el que se utilizó un tipo salvaje como célula huésped y, más aun, también se produjo DHBP en cantidades importantes.

También se investigó como método para la preparación de las células huésped altamente sintetizadoras de GTP la introducción del gen *guaBA*, que codifica la IMP deshidrogenasa y la GMP sintasa y convierte el ácido inosínico en ácido guanílico, en la célula para aumentar la actividad de dichas enzimas. Como resultado se encontró que, cuando el gen *guaBA* se introducía en *Escherichia coli* que es la cepa mutante reguladora anteriormente mencionada para la síntesis de purina y dicha célula genéticamente recombinante se utiliza como célula huésped, la producción del compuesto de biopterina se incrementó adicionalmente en comparación con el uso de la cepa mutante reguladora anteriormente mencionada para la síntesis de purina.

Asimismo, los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación exhaustiva para aumentar la productividad del compuesto de biopterina y, como resultado, encontraron que, cuando el gen para la enzima que participa en la síntesis de THBP se introduce en la célula huésped varias veces para aumentar la cantidad expresada, se produjo una mejora en la productividad del compuesto de biopterina. Inesperadamente, se encontró que, en particular cuando el gen de GCH que es una enzima para catalizar la primera etapa de reacción para la síntesis de THBP se introduce en la célula huésped varias veces para aumentar la cantidad expresada de GCH, la productividad del compuesto de biopterina aumentaba considerablemente.

En base al descubrimiento mencionado anteriormente de que la productividad para el compuesto de biopterina aumenta considerablemente cuando el gen de GCH se introduce en las células huésped varias veces, se investigó el uso del gen de GCH de *Bacillus subtilis* (que también puede denominarse gen *mtrA*), con lo cual se encontró inesperadamente que la cantidad producida del compuesto de biopterina se incrementó aun más.

De esta forma, la presente invención es capaz de proporcionar un proceso industrialmente ventajoso para producir el compuesto de biopterina, tal como THBP, y también de proporcionar células transformadas y células huésped que son útiles para dicha producción.

Como resultado de investigaciones adicionales, los inventores de la presente invención han desarrollado la presente invención.

Así, la presente invención se refiere al objeto definido en las reivindicaciones. En la presente invención también se describe:

(1) En un proceso para la producción del compuesto de biopterina por parte de una célula transformada, un proceso para la producción del compuesto de biopterina caracterizado porque (a) una célula huésped es transformada por al menos un gen de enzima que participa en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, (b) la célula transformada resultante se cultiva para producir tetrahidrobiopterina, (c) la tetrahidrobiopterina resultante se oxida si es necesario y (d) se recogen uno o más compuestos de biopterina seleccionados de la tetrahidrobiopterina y la dihidrobiopterina y la biopterina resultantes, en donde dicha tetrahidrobiopterina se oxida;

(2) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (1) precedente, en donde el compuesto de biopterina en el caldo de cultivo o en un producto procesado del mismo se oxida y se recoge biopterina del mismo;

(3) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) o (2) precedentes, en donde la dihidrobiopterina y/o biopterina recogidas se reducen para producir tetrahidrobiopterina;

(4) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) a (3) precedentes, en donde la o las enzimas que participan en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina son de uno a tres tipos de enzimas seleccionadas del grupo que consiste en GTP ciclohidrolasa I, 6-piruviltetrahidropterina sintasa y sepiapterina reductasa;

(5) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) a (3) precedentes, en donde la transformación se lleva a cabo mediante un vector de expresión que tiene gen de 6-piruviltetrahidropterina sintasa y gen de sepiapterina reductasa;

(6) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (5) precedente, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una actividad GTP ciclohidrolasa I que no es menor que la actividad GTP ciclohidrolasa I inherente a la célula de tipo salvaje;

(7) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (4) precedente, en donde el gen de GTP ciclohidrolasa I que ha de introducirse en la célula huésped es un gen *mtrA* derivado de *Bacillus subtilis*;

(8) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) a (7) precedentes, en donde la célula huésped es una célula procariota;

(9) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (8) precedente, en donde la procariota es *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o *Actinomyces*;

(10) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) a (7) precedentes, en donde la célula huésped es una célula eucariota;

(11) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (10) precedente, en donde la eucariota es una levadura u hongo filamentoso;

(12) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (11) precedente, en donde la levadura es levadura que asimila metanol o levadura de fisión;

(13) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (11) precedente, en donde la levadura es levadura *Saccharomyces*;

(14) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) a (13) precedentes, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una capacidad de sintetizar GTP no menor que la capacidad de sintetizar GTP de la célula de tipo salvaje;

(15) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (14) precedente, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una resistencia a la 8-azaguanina no menor que la resistencia a la 8-azaguanina de la célula de tipo salvaje;

(16) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (14) o (15) precedentes, en donde la célula huésped es una célula genéticamente recombinante en la cual se introduce gen *guaBA* que codifica la IMP deshidrogenasa y GMP sintasa;

ES 2 320 531 T3

(17) una célula transformada utilizada para la producción del compuesto de biopterina mencionado en los párrafos (1) a (16) precedentes en donde un gen de una enzima que participa en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina se introduce en una célula huésped:

(18) la célula transformada de acuerdo con el párrafo (17) precedente, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una capacidad de sintetizar GTP no menor que la capacidad de sintetizar GTP de la célula de tipo salvaje;

(19) la célula transformada de acuerdo con el párrafo (18) precedente, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una resistencia a la 8-azaguanina no menor que la resistencia a la 8-azaguanina de la célula de tipo salvaje;

(20) la célula transformada de acuerdo con los párrafos (18) o (19) precedentes, en donde la célula huésped es una célula genéticamente recombinante en la cual se introduce gen *guaBA* que codifica la IMP deshidrogenasa y GMP sintasa;

(21) la célula transformada de acuerdo con el párrafo (18) precedente, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una actividad GTP ciclohidrolasa I que no es menor que la actividad GTP ciclohidrolasa I inherente a la célula de tipo salvaje y se introducen gen de 6-piruviltetrahidropterina sintasa y gen de sepiapterina reductasa en dicha célula huésped;

(22) la célula transformada de acuerdo con los párrafos (17)-(21) precedentes, en donde el gen de GTP ciclohidrolasa I que ha de introducirse en la célula huésped es el gen *mtrA* derivado de *Bacillus subtilis*;

(23) el proceso para la producción del compuesto de biopterina mencionado en el párrafo (14) o (15) precedente, en donde se utiliza una célula transformada en la que se introduce el gen *guaBA* que codifica la IMP deshidrogenasa y GMP sintasa en la célula huésped; y

(24) una célula transformada mencionada en el párrafo (18) o (19) precedente en donde el gen *guaBA* que codifica la IMP deshidrogenasa y GMP sintasa se introduce en una célula huésped.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una vía para la biosíntesis de la tetrahidrobiopterina.

La Fig. 2 muestra una vía para la oxidación y descomposición de la tetrahidrobiopterina.

La Fig. 3 muestra las etapas para la preparación de pSTV28-GCH. PCR (P1, P2) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P1 y el cebador antisentido P2. PCR (P3, P4) y PCR (P5, P6) también tienen significados similares. Ap significa gen resistente a la ampicilina y Cm significa gen resistente al cloranfenicol. *trc* significa promotor *trc* y *lac* significa promotor *lac*.

La Fig. 4 muestra las etapas para la preparación de pUC18-PTPS. PCR (P7, P8) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P7 y el cebador antisentido P8. PCR (P9, P10) y PCR (P11, P12) también tienen significados similares. Ap significa gen resistente a la ampicilina. *trc* significa promotor *trc* y *lac* significa promotor *lac*.

La Fig. 5 muestra las etapas para la preparación de pUC19-SPR. PCR (P13, P14) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P13 y el cebador antisentido P14. PCR (P15, P16) y PCR (P17, P18) también tienen significados similares. Ap significa gen resistente a la ampicilina. *trc* significa promotor *trc* y *lac* significa promotor *lac*.

La Fig. 6 muestra las etapas para la preparación de pYES2-FOL2. PCR (P23, P24) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P23 y el cebador antisentido P24. Ap significa gen resistente a la ampicilina y URA3 significa un marcador selectivo en levadura. ^PGAL1 significa promotor GAL1 y CYC1 TT significa la señal de terminación de la transcripción del gen CYC1.

La Fig. 7 muestra las etapas para la preparación de pSTV28-GPS. PCR (P19, P20) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P19 y el cebador antisentido P20. PCR (P21, P22) también tiene un significado similar. Ap significa gen resistente a la ampicilina y Cm significa gen resistente al cloranfenicol. *lac* significa promotor *lac*. Ori significa origen de la replicación.

La Fig. 8 muestra las etapas para las preparaciones de pYES2-PTPS y pYES2-SPR. PCR (P25, P26) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P25 y el cebador antisentido P26. PCR (P27, P28) también tiene un significado similar. Ap significa gen resistente a la ampicilina y URA3 significa el gen URA3 utilizado como marcador selectivo en levadura. *lac* significa promotor *lac*, ^PGAL1 significa promotor GAL1 y CYC1 TT significa señal de terminación de la transcripción del gen CYC1.

La Fig. 9 muestra las etapas para las preparaciones de pYES2-FPS. PCR (P29, P30) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P29 y el cebador antisentido P30. PCR (P31, P32) también tiene un significado similar. Ap significa

ES 2 320 531 T3

gen resistente a la ampicilina y URA3 significa un marcador selectivo en levadura. ^PGAL1 significa promotor GAL1 y CYC1 TT significa señal de terminación de la transcripción del gen CYC1.

La Fig. 10 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de GCH clonada en pSTV28-GCB. La parte subrayada muestra una secuencia derivada de pSTV28 que ha de agregarse al extremo amino de GCH.

La Fig. 11 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de PTPS clonada en pUC18-PTPS. La parte subrayada muestra una secuencia derivada de pUC18 que ha de agregarse al extremo amino de PTPS.

La Fig. 12 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de SPR clonada en pUC19-SPR. La parte subrayada muestra una secuencia derivada de pUC19 que ha de agregarse al extremo amino de SPR.

La Fig. 13 muestra el resultado del análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo del compuesto de biopterina que produce JM101/pSTV28-GPS de *Escherichia coli* mediante una columna C18 de fase inversa.

La Fig. 14 muestra curvas de crecimiento de compuesto de biopterina-levadura productiva (cepa FPS).

La Fig. 15 muestra el resultado del análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo del compuesto de biopterina que produce levadura (cepa FPS) mediante una columna C18 de fase inversa.

La Fig. 16 muestra el resultado del análisis por TLC del sobrenadante de cultivo del compuesto de biopterina que produce levadura (cepa FPS).

La Fig. 17 muestra el resultado del análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo del compuesto de biopterina que produce AG14/pSTV28-GPS de *Escherichia coli* mediante una columna C18 de fase inversa.

La Fig. 18 muestra el transcurso del tiempo de la producción de BP y P por parte de AG14/pSTV28-GPS de *E. coli* y el transcurso del tiempo de OD660 de caldo de cultivo.

La Fig. 19 muestra las etapas para la preparación de pMW218-guaBA. PCR (P33, P34) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P33 y el cebador antisentido P34. Ap significa gen resistente a la ampicilina y km significa gen resistente a la kanamicina. lac significa promotor lac.

La Fig. 20 muestra las etapas para la preparación de pSTV28-MPS. PCR (P35, P36) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P35 y el cebador antisentido P36. PCR (P37, P38) también tiene un significado similar. Ap significa gen resistente a la ampicilina y km significa gen resistente a la kanamicina. Ori significa origen de la replicación.

La Fig. 21 muestra el transcurso del tiempo de la producción de BP por parte de AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA) y AG14/(pSTV28-MPS, pMW218-guaBA) de *E. coli* y el transcurso del tiempo de OD660 del caldo de cultivo. En el dibujo, ■ muestra cambios con un lapso de tiempo de OD660 para AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA); ● muestra cambios con un lapso de tiempo de OD660 para AG14/(pSTV28-MPS, pMW218-guaBA); □ muestra cambios con un lapso de tiempo de la cantidad de BP producida para AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA); y O muestra cambios con un lapso de tiempo de la cantidad de BP producida para AG14/(pSTV28-MPS, pMW218-guaBA).

La Fig. 22 muestra las etapas para la preparación de pUC18SD. Ap significa gen resistente a la ampicilina. lac significa promotor lac.

La Fig. 23 muestra las etapas para la preparación de pUC18ΔE. Ap significa gen resistente a la ampicilina. lac significa promotor lac.

La Fig. 24 muestra las etapas para la preparación de pUC18ΔESDmtrA. PCR (P43, P44) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P43 y el cebador antisentido P44. PCR (P45, P46) y PCR (P45, P47) también tienen significados similares. Ap significa gen resistente a la ampicilina, mtrA significa gen mtrA y SD significa gen que contiene secuencia SD y secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción. lac significa promotor lac.

La Fig. 25 muestra las etapas para la preparación de pUC18SDPTPS. PCR (P50, P48) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P50 y el cebador antisentido P48. PCR (P50, P49) también tiene un significado similar. Ap significa gen resistente a la ampicilina, PTPS significa gen de PTPS y SD significa gen que contiene secuencia SD y secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción. lac significa promotor lac.

La Fig. 26 muestra las etapas para la preparación de pUC18ΔESDSPR. PCR (P53, P51) significa una PCR que utiliza el cebador sentido P53 y el cebador antisentido P51. PCR (P53, P52) también tiene un significado similar. Ap significa gen resistente a la ampicilina. SPR significa gen de SPR y SD significa gen que contiene secuencia SD y secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción. lac significa promotor lac.

ES 2 320 531 T3

La Fig. 27 muestra las etapas para la preparación de pSL1180PS. Ap significa gen resistente a la ampicilina, PTPS significa gen de PTPS, SPR significa gen de SPR y SD significa gen que contiene secuencia SD y secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción. lac significa promotor lac.

5 La Fig. 28 muestra las etapas para la preparación de pSL1180MPS. Ap significa gen resistente a la ampicilina, PTPS significa gen de PTPS, SPR significa gen de SPR, mtrA significa gen mtrA y SD significa gen que contiene secuencia SD y secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción. lac significa promotor lac.

10 La Fig. 29 muestra las etapas para la preparación de pDG148MPS. Km significa gen resistente a la kanamicina, Ap significa gen resistente a la ampicilina, PTPS significa gen de PTPS, SPR significa gen de SPR y mtrA significa gen mtrA. Pspac significa promotor spac, lacO significa promotor lacO y lacI significa gen lacI. Ori significa origen para la replicación.

15 La Fig. 30 muestra las etapas para la preparación de pDG148MPSΔI. Km significa gen resistente a la kanamicina, Ap significa gen resistente a la ampicilina, PTPS significa gen de PTPS, SPR significa gen de SPR y mtrA significa gen mtrA. Pspac significa promotor spac, lacO significa promotor lacO y lacI significa gen lacI. Ori significa origen para la replicación.

20 La Fig. 31 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de mtrA clonada en pUC18ΔESDmtrA. La parte subrayada muestra una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína CcpA que ha de agregarse al extremo amino de mtrA (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998) y una secuencia base correspondiente a la misma.

25 La Fig. 32 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de PTPS clonada en pUC18SDPTPS. La parte subrayada muestra una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína CcpA que ha de agregarse al extremo amino de PTPS (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998) y una secuencia base correspondiente a la misma.

30 La Fig. 33 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de SPR clonada en pUC18ΔESDSPR. La parte subrayada muestra una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína CcpA que ha de agregarse al extremo amino de SPR (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998) y una secuencia base correspondiente a la misma.

35 La Fig. 34 muestra el análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo de las cepas de *Bacillus subtilis* 1A1/pDG148MPS y 1A1/pDG148MPSΔI.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

40 Con respecto a la enzima que es capaz de participar en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, en la Fig. 1 se muestran ejemplos de enzimas tales como guanosina trifosfato ciclohidrolasa I (GCH), 6-piruvoyltetrahidropterina sintasa (PTPS) y sepiapterina reductasa (SPR).

45 Con respecto al gen que ha de introducirse en una célula huésped, puede utilizarse cualquier entidad siempre y cuando contenga un gen que codifique para la enzima anteriormente mencionada. Para ser más específicos, no solamente puede utilizarse ADN que contiene gen de GCH derivado de *Escherichia coli* tal como se muestra en la Fig. 10 o gen de GCH derivado de *Bacillus subtilis* tal como se muestra en la Fig. 31, gen de PTPS derivado de rata tal como se muestra en la Fig. 11 y la Fig. 32 y gen de SPR derivado de rata tal como se muestra en la Fig. 12 y la Fig. 33, sino también ADN que se hibridiza con dicho ADN. Ejemplos del ADN que es capaz de hibridizarse con dicho ADN son ADN que contiene una secuencia base que tiene una homología no menor que aproximadamente 80%,
50 preferiblemente no menor que aproximadamente 85%, más preferiblemente no menor que aproximadamente 90% y, aun más preferiblemente, no menor que aproximadamente 95% con la secuencia base que se muestra en las Figs. 10-12 y las Figs. 31-33.

55 La hibridación puede llevarse a cabo mediante un método conocido o un método similar al método mencionado en "Molecular Cloning" 2ª edición (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Cuando se utiliza un kit o biblioteca de ADNc de venta en el mercado puede utilizarse un método mencionado en las instrucciones adjuntas a los mismos. Más preferiblemente, la hibridación puede llevarse a cabo en condiciones muy rigurosas. Un ejemplo de condición muy rigurosa es una condición en la que la concentración de sodio es de aproximadamente 19 a 40 mM o, preferiblemente, aproximadamente 19 a 20 mM y la temperatura es de aproximadamente 50 a 70°C o, preferiblemente, aproximadamente 60 a 65°C. En particular, se prefiere mayormente el caso en el que la concentración de sodio es de aproximadamente 19 mM y la temperatura es de aproximadamente 65°C.

65 El ADN, una vez introducido en una célula huésped, puede ser ADN genómico, ADNc derivado de células o tejidos o ADN sintético. El vector utilizado para la introducción del gen puede ser bacteriófago, plásmido o cósmido. Más aun, puede amplificarse directamente ADNc mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (de aquí en adelante abreviada RT-PCR) mediante la utilización de ARN total o fracción de ARNm preparado a partir de las células o tejidos mencionados anteriormente. Más aun, puede utilizarse aquel que es fabricado mediante un método sintético para oligonucleótidos conocido. Para ser más específicos, un ejemplo es un método en el que la

síntesis química se lleva a cabo con un sintetizador de ADN tal como el modelo 392 (fabricado por Perkin Elmer), utilizando un método de fosforamidita.

Más específicamente, por ejemplo, puede prepararse ADN que contenga un gen dirigido que ha de introducirse en una célula huésped tal como se describe más adelante.

Con respecto a la GCH, que es una enzima que cataliza la reacción de la primera etapa en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, la misma se encuentra presente en muchas células huésped tales como *Escherichia coli*, células de levadura, etc., así como también en animales como enzima que participa en la síntesis del ácido fólico y, por lo tanto, puede prepararse fácilmente ADN que codifica GCH, por ejemplo mediante (1) un método en el que la PCR se lleva a cabo mediante la utilización de un cebador de ADN sintético que tiene una secuencia de base parcial de dicho ADN por medio de lo cual el ADN que contiene el gen dirigido se amplifica a partir de una biblioteca de genes, etc. o (2) un método en el cual la selección se lleva a cabo mediante hibridación de una genoteca adecuada con una entidad etiquetada con un fragmento de ADN o con un ADN sintético que codifica una parte o la totalidad de la región de GCH (sonda). Estos métodos pueden utilizarse de forma apropiada en la presente invención y el primero es el más preferido de los dos.

Un método para la hibridación puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante un método mencionado en "Molecular Cloning" 2ª edición (J. Sambrook, *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc. Cuando se utiliza una biblioteca o kit de venta en el mercado puede utilizarse un método mencionado en las instrucciones adjuntas a los mismos. También puede fabricarse ADN que tenga una secuencia base parcial utilizada como sonda para la hibridación de acuerdo con un método sintético para oligonucleótidos conocido.

En la presente invención se prefiere utilizar gen de GCH de *Escherichia coli* (que también puede denominarse gen folE), gen de GCH de levadura (que también puede denominarse gen FOL2) o gen de GCH de *Bacillus subtilis* (que también puede denominarse gen mtrA) como gen de GCH y se prefiere mayormente el uso del gen de GCH de *Bacillus subtilis*.

Para obtener ADN que codifica PTPS y SPR que lleva a cabo las reacciones de la segunda etapa y la tercera etapa para la biosíntesis de tetrahidrobiopterina se prefiere un método en el cual el ARNm se extrae de hígado de rata y luego se somete a una RT-PCR. Para extraer dicho ARNm puede utilizarse un método conocido. Las células se destruyen parcial o completamente mediante la utilización de un agente tensioactivo tal como NP-40, SDS, Triton X 100 o ácido desoxicolico o la utilización de un medio físico tal como un homogenizador o congelación-fusión y luego se separa el ARNm. Para evitar la degradación del ARN por parte de la RNasa durante la extracción, se prefiere agregar un inhibidor de RNasa tal como heparina, sulfato de polivinilo, bentonita, macaloide, pirocarbonato de dietilo o complejo de vanadio al extracto. Con respecto a la purificación del ARNm que contiene poliA, la misma puede llevarse a cabo mediante un método de purificación mediante cromatografía en columna de afinidad mediante la utilización de poli U-Sefarosa o similar, en donde la oligo dT-celulosa o la Sefarosa 2B es un portador o mediante un método por lotes mediante la utilización de poli U-Sefarosa o similar, fraccionamiento mediante un método centrífugo de SDG o mediante un método electroforético en agarosa.

El ADNc se sintetiza a partir de una fracción de ARNm que contiene ARNm correspondiente a PTPS y SPR obtenidas de esta forma. Con respecto a un método para la síntesis de ADNc, pueden utilizarse métodos conocidos y se ejemplifica un método en el cual, en primer lugar, se sintetiza un ADN de cadena simple complementario al ARNm mediante transcriptasa inversa en presencia de dATP, dGTP, dCTP y dTTP utilizando ARNm como molde y oligo dT como cebador, luego el ARNm molde se digiere y elimina mediante tratamiento con un álcali y, posteriormente, se sintetiza ADNc de doble cadena mediante transcriptasa inversa o ADN polimerasa utilizando dicho ADNc de cadena simple como molde.

Para seleccionar el ADNc que contiene el gen de la enzima que participa en la síntesis de THBP tal como GCH, PTPS o SPR de la biblioteca de ADNc preparada de esta forma se utiliza un método de hibridación en el que el fragmento de ADN que contiene dicho gen de enzima es una sonda. Con respecto al método de hibridación, pueden utilizarse los métodos conocidos como los mencionados anteriormente en la presente. Para verificar que el ADNc seleccionado codifica la enzima que participa en la síntesis de THBP tal como GCH, PTPS o SPR, el mismo puede llevarse a cabo de manera tal que el ADNc se integre, por ejemplo, en el vector que es reproducible en células de *Escherichia coli* o COS y el vector se introduce en células de *Escherichia coli* o COS, con lo cual se expresa la enzima.

La célula transformada de acuerdo con la presente invención usualmente es una entidad en la que puede producirse el compuesto de biopterina o en la que la productividad del compuesto de biopterina mejora con la introducción de un gen de al menos dos enzimas que participan en la síntesis de THBP precedente en la célula huésped.

Por lo tanto, la célula huésped puede ser tal que inherentemente no tenga capacidad de producir el compuesto de biopterina o que tenga algo de capacidad de producir el compuesto de biopterina. De este modo, algunas de las células huésped tienen inherentemente de 1 a 3 tipos de genes de las enzimas que participan en la síntesis de THBP precedente y expresan bien dichos 1 a 3 tipos de enzimas. En este caso, en lo que a dicha enzima o enzimas respecta, el o los genes de dicha enzima o enzimas no tienen por qué introducirse en la célula huésped. Naturalmente, es posible introducirlo (s) para mejorar la productividad del compuesto de biopterina. Sin embargo, si ese no es el caso o, en otras palabras,

el o los genes de la o las enzimas mencionadas anteriormente no están presentes, usualmente es necesario introducir el gen de dicha enzima y, en caso de que dicho gen esté presente pero la enzima no esté lo suficientemente expresada, se prefiere introducir el gen de dicha enzima.

- 5 Por ejemplo, las células huéspedes pueden ser procariotas, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* o pueden ser eucariotas, tales como levadura.

Un ejemplo específico de bacteria del género *Escherichia* es el denominado colibacilo y ejemplos del mismo son K12.DH1 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 60, 160 (1968)], JM101, JM103 [*Nucleic Acids Research*, volumen 9, 309 (1981)], JA221 [*J. Mol. Biol.*, volumen 120; 517 (1978)], HB101 [*J. Mol. Biol.*, volumen 41, 459 (1969)] y C600 [*Genetics*, volumen 39, 440 (1954)] de *Escherichia coli*. De entre ellos, se prefiere utilizar el JM101 de *Escherichia coli* en la presente invención.

15 Un ejemplo de bacteria del género *Bacillus* es el denominado bacilo del heno, cuyos ejemplos son la cepa 1A1 (*trpC2*) (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998) o MI114 [*Gene*, volumen 24, 255 (1983)] y 207-21 [*Journal of Biochemistry*, volumen 95, 87 (1984)] de *Bacillus subtilis*. En la presente invención, se prefiere particularmente el uso del primero.

20 Con respecto a la levadura, se prefiere el uso de levadura del género *Saccharomyces*. Ejemplos de levadura del género *Saccharomyces* son KA31, AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D y 20B-12 de *Saccharomyces cerevisiae*. De entre ellas, se prefiere el uso de la levadura del género *Saccharomyces* y particularmente se prefiere el uso de la KA31 de *Saccharomyces cerevisiae* en la presente invención.

25 Con respecto a la célula huésped de acuerdo con la presente invención, puede utilizarse una célula mutante que tiene una capacidad de sintetizar GTP no menor que la capacidad de sintetizar GTP de la célula tipo salvaje de la célula huésped mencionada anteriormente. Esto se debe a que, dado que la GTP, que es una sustancia de inicio para la síntesis de THBP, es un tipo de compuesto de purina, la cantidad suministradora de GTP, que es una sustancia de inicio, aumenta cuando se utiliza un mutante regulador de la vía de la síntesis de purina en donde la capacidad de sintetizar GTP aumenta y, como resultado, la producción del compuesto de bipterina también aumenta. Para obtener un mutante regulador de la vía de la síntesis de purina puede utilizarse un método conocido. Por ejemplo, puede mencionarse un método en el que la incubación se lleva a cabo utilizando un medio al cual se agrega un análogo de purina y se selecciona un mutante que tiene una resistencia al análogo de purina. Con respecto al análogo de purina, puede utilizarse una sustancia conocida, como por ejemplo 8-azaguanina y decoinina, las que pueden utilizarse de manera ventajosa. Para ser más específicos, se informa que, en el caso de *B. subtilis*, dicha célula mutante puede obtenerse mediante la preparación de un mutante que tenga una resistencia a los análogos de purina tales como 8-azaguanina y decoinina y otros antagonistas tales como sulfóxido de metionina (por ejemplo, Ishii y Shiio, *Agric. Biol. Chem.* 36:1511-1522, 1972; Matsui, *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 43:1739-1744, 1979).

40 Más adelante se mencionará una realización preferida para obtener una célula mutante que tiene resistencia a la 8-azaguanina que no es menor que la resistencia a la 8-azaguanina de la célula tipo salvaje en el caso de *Escherichia coli*. De esta manera, dado que la cepa JM101 de *Escherichia coli* que es una célula huésped tiene una sensibilidad a no menos de aproximadamente 100 µg/ml de 8-azaguanina y a aproximadamente 500 µg/ml de decoinina, la cepa JM101 de *Escherichia coli* que se somete a un tratamiento de mutación con N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina mediante la utilización de medio mínimo de agar-agar que contiene aproximadamente 100 µg/ml de 8-azaguanina o aproximadamente 500 µg/ml de decoinina se siembra, con lo cual puede obtenerse una cepa resistente para cada una de ellas.

Mediante una técnica de ingeniería genética es posible preparar una célula huésped que tenga una capacidad de sintetizar GTP que no sea menor que la capacidad de sintetizar GTP de una célula tipo salvaje de la célula huésped mencionada anteriormente. De esta manera, puede utilizarse una célula recombinante en la que se introduce el gen para aumentar la capacidad de sintetizar GTP tal como el gen de la enzima del sistema de biosíntesis de GTP en una célula tipo salvaje o célula mutante como la que tiene una alta capacidad de sintetizar GTP como célula huésped. Con respecto al gen que mejora la capacidad de sintetizar GTP, puede utilizarse uno que sea conocido. Con respecto a dicho gen, puede introducirse un tipo en una célula tipo salvaje o mutante o pueden introducirse dos o más genes en una célula tipo salvaje o mutante. Para ser más específicos, con respecto a un método para la preparación de una célula recombinante en la que la capacidad de sintetizar GTP se encuentra mejorada, puede ejemplificarse un método en el que se introducen genes *guaBA* que codifican la IMP deshidrogenasa y GMP sintasa que llevan a cabo la conversión de ácido inosínico en ácido guanílico (Tiedeman, A. A., *et al.* *J. Biol. Chem.* 260:8676-8679, 1985 y *Nucleic Acids Res.* 13:1303-1316, 1985 (GenBank M10101)) en una célula tipo salvaje o mutante. Un método para la introducción de genes tal como *guaBA* en una célula tipo salvaje o mutante puede llevarse a cabo fácilmente mediante un método conocido, tal como el siguiente método.

65 En la presente invención, pueden introducirse genes de al menos dos tipos de enzimas que participan en la síntesis de THBP en la célula huésped mencionada anteriormente. De este modo, pueden introducirse todos los genes de las enzimas que participan en la síntesis de THBP o solamente genes de una parte de dichas enzimas. Para ser específicos, pueden ejemplificarse los casos en los que se introducen (a) genes de GCH, PTPS y SPR y (b) dos genes de GCH, PTPS y SPR.

También se prefiere aumentar la cantidad expresada mediante la introducción del gen de la misma enzima varias veces. Se prefiere particularmente que el gen de GCH se introduzca varias veces y el origen del gen de GCH puede ser el mismo o diferente.

- 5 Un aspecto de la presente invención consiste en introducir los genes de PTPS y SPR porque la GCH se encuentra presente en muchas células huésped tales como *Escherichia coli* y levadura como una enzima que participa en la síntesis del ácido fólico.

- 10 En el caso de la producción del compuesto de bipterina en donde se introducen y expresan genes de dos tipos de enzimas -PTPS y SPR - mientras que, con respecto a la GCH, se utiliza la que tiene la célula huésped, se prefiere usar, como célula huésped, una célula mutante que tenga una actividad enzimática no menor que la GTP ciclohidrolasa I intrínseca que tiene la célula tipo salvaje.

- 15 Con respecto a un método para obtener dicha célula mutante, se ejemplifican un método en el cual se obtiene un mutante del promotor del gen de GCH existente en cromosoma, un método en el cual se introduce un nuevo promotor corriente arriba del gen de GCH en cromosoma y un método en el cual se mejora la actividad específica en comparación con la de la célula de tipo salvaje como resultado de la mutación del gen estructural de GCH.

- 20 Con respecto a un método para la introducción del gen de la enzima que participa en la biosíntesis de tetrahidro-biopterina en la célula huésped mencionada anteriormente, pueden utilizarse métodos que son conocidos. Ejemplos específicos de dichos métodos son (a) un método en el cual dicho gen se integra al cromosoma de la célula huésped y (b) un método en el cual el gen se hace presente como un plásmido mediante el uso de un vector. De entre ellos, el método de utilización del vector es el preferido dado que el ADN puede introducirse de manera eficaz.

- 25 Con respecto al método (a) mencionado anteriormente de acuerdo con la presente invención en el cual el gen de la enzima mencionada anteriormente se integra al cromosoma de la célula huésped, se ejemplifica un método en el cual un extremo de un tubo de vidrio se estrecha tirando del mismo, se coloca ADN adentro, se hace penetrar en la célula y se introduce ya sea por medios electroforéticos o por presión causada mediante el envío de aire o gas nitrógeno. Otro ejemplo es un método de pistola de partículas en el cual se rocían partículas muy finas de oro o plata con ADN y las partículas adheridas al ADN se disparan a la célula huésped mediante pólvora o gas de alta presión de forma tal que el ADN se introduce en la misma. Otro ejemplo es el de una electroporación en la que la célula huésped y el ADN se colocan en un recipiente y se les aplica voltaje, con lo cual se produce un poro transitorio en la célula huésped por el cual se incorpora el ADN [Neumann, E., *et al.* *EMBO J.* 1. 841-845 (1982)].

- 35 Con respecto a un método para la introducción de un gen relacionado con la presente invención en una célula huésped mediante la utilización de un vector, puede utilizarse un método conocido. Con respecto al vector, se prefiere utilizar un vector de expresión que proporcione ARNm estable en grandes cantidades y se fabrica de forma de que traduzca eficazmente el ARNm resultante en la célula huésped. Cuando se introducen varios genes, es deseable utilizar vectores que tengan distinto origen para la replicación tanto en el caso de los mismos genes como de diferentes genes. Con respecto al vector utilizado, se ejemplifican plásmido derivado de *Escherichia coli* (tal como pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19 y pSTV28), plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (tal como pUB110, pTP5 y pC194), plásmido derivado de levadura (tal como pSH19, pSH15 y pYES2), bacteriófago tal como fago λ , virus animales tales como retrovirus, virus vaccinia y baculovirus, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV y pCDNAI/Neo.

- 45 El vector de expresión usualmente contiene la secuencia reguladora de forma tal de expresar la enzima de la presente invención o llevar a cabo la expresión de manera ventajosa. Cada secuencia reguladora puede ser nativa o extraña con respecto a la secuencia base que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de la enzima. Dicha secuencia reguladora incluye, a modo no taxativo, promotor, líder, secuencia poliadenilada, secuencia propeptídica, potenciador, secuencia señal, señal de empalme, señal poli A agregada, origen de replicación de SV40 (de ahora en adelante denominado SV40ori) y terminador de la transcripción. De entre los anteriores, la secuencia reguladora preferida contiene al menos promotor y señales de terminación de la transcripción y la traducción.

- 55 Con respecto al promotor, puede utilizarse cualquiera siempre y cuando sea una secuencia promotora adecuada que es una secuencia base reconocible por la célula huésped. Cuando la célula huésped es una bacteria del género *Escherichia*, pueden ejemplificarse el promotor trp, el promotor trc, el promotor lac, el promotor recA, el promotor λ PL, el promotor lpp y el promotor T7. De entre estos, los preferidos son el promotor trc y el promotor lac. Cuando la célula huésped es una bacteria del género *Bacillus*, pueden ejemplificarse el promotor SPO1, el promotor SPO2 y el promotor penP. Cuando la célula huésped es una bacteria del orden *Actinomycetales*, puede ejemplificarse el promotor tipA, que es un promotor que induce un antibiótico tiostreptón (Murakami, T., *et al.* (1989) *J. Bacteriol.*, 171, 1459), etc.

- 60 Cuando la célula huésped es una levadura, pueden ejemplificarse el promotor PHO5, el promotor PGK, el promotor GAL, el promotor GAP, el promotor ADH y el promotor AOX1. De entre ellos, se prefiere el promotor GAL.

- 65 Con respecto al terminador de la transcripción, puede utilizarse cualquier secuencia en la medida en que sea reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción.

Cuando la célula huésped es levadura, pueden ejemplificarse el terminador PHO5, el terminador PGK, el terminador GAL, el terminador GAP, el terminador ADH y el terminador AOX1.

El vector de expresión puede incluir una secuencia señal relacionada con la secreción de proteína.

Con respecto a la secuencia señal, puede utilizarse una secuencia señal del gen que ha de introducirse o una secuencia señal de un gen diferente.

Con respecto a la secuencia señal del gen diferente, puede ejemplificarse la fosfatasa alcalina cuando la célula huésped es una bacteria del género *Escherichia* y, cuando la célula huésped es una bacteria del género *Bacillus*, puede ejemplificarse una secuencia señal de α -amilasa y una secuencia señal de subtilisina.

Cuando la célula huésped es levadura, puede ejemplificarse la secuencia señal de MF α y la secuencia señal de SUC2.

El vector de expresión puede incluir un marcador selectivo. Por ejemplo, en el caso de una procariota tal como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, pueden utilizarse distintos genes resistentes a fármacos mientras que, en el caso de microbios eucariotas tales como levadura, pueden utilizarse genes complementarios de la auxotrofia del huésped como marcador selectivo. Para ser más específico, pueden ejemplificarse el gen de reductasa de ácido dihidrofólico, el gen resistente al metotrexato (MTX), el gen resistente a la ampicilina, el gen resistente a la neomicina (resistente a G418), el gen resistente al cloranfenicol, el gen resistente a la kanamicina y el gen URA3.

El vector de expresión puede incluir una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más factores (tal como activador (por ejemplo, factor de actuación en trans); chaperona, secuencia SD y proteasa procesadora) que son ventajosos para la expresión del gen de la enzima de la presente invención.

Puede utilizarse cualquier factor que sea funcional en la célula huésped como vector de expresión de la presente invención.

En la presente invención también puede utilizarse un vector de expresión conocido. Por ejemplo, puede mencionarse el PIN-III-ompA₂, etc., para una célula huésped de *Escherichia coli*. Otros ejemplos son pNJ1053 para célula huésped de levadura. Además, puede utilizarse el vector lanzadera pDG148 (Karmazyn-Campelli, *et al.*, *Cell*, 52, 697-704, 1988) para *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* y se utiliza de manera ventajosa en la presente invención.

Con respecto a un método para integrar ADNc, etc. que contiene el gen de una enzima que participa en la biosíntesis de THBP precedente relacionada con la presente invención, puede utilizarse un método conocido, tal como escisión por parte de una enzima de restricción seguida por una unión por una ADN ligasa. Con respecto al ADNc, etc. mencionados anteriormente, pueden llevarse a cabo previamente varios tratamientos con exonucleasa, la adición de un fragmento de ADN sintetizado químicamente y la adición de sitios de escisión para enzimas de restricción mediante unión de enlazador o mediante PCR de forma tal de que se integre fácilmente con el vector precedente o la cadena G,C se alarga de forma tal de agregar un extremo conectable al extremo de ADN o ADNc de doble cadena del vector.

Cuando el vector que contiene el gen de la enzima que es capaz de participar en la biosíntesis de THBP construido de esta forma se introduce en una célula huésped, es posible fabricar una célula transformada de acuerdo con la presente invención.

Con respecto a un método para la transformación mediante introducción de dicho vector de expresión en la célula huésped, pueden utilizarse métodos conocidos. Cuando la célula huésped es procariota, tal como una bacteria del género *Escherichia*, la introducción puede llevarse a cabo mediante la recuperación de las células en una fase de crecimiento logarítmico y luego sometimiento a un método de CaCl₂ conocido (Graham, F. L. y van der Eb, A. J. *Virology*, 52, 456-967 (1973)). Cuando MgCl₂ o RbCl se incluyen en la solución de reacción de la transformación, la eficacia de la transformación puede mejorarse y, por lo tanto, pueden incluirse en la presente invención. También es posible llevar a cabo una transformación luego de la preparación del protoplasto de la célula huésped.

Cuando la célula huésped utilizada es eucariota, es posible realizar la introducción mediante métodos comunes tales como un método en el cual el ADN se infecta como un precipitado de fosfato de calcio, un método de microinyección, un método en el cual la introducción se lleva a cabo mediante la inclusión de plásmido con célula eritrocítica o liposoma, un método para tratar la célula con un reactivo tal como lisofosfatidilcolina y un método en el cual se utiliza un vector de virus. Cuando la célula huésped es levadura, es posible utilizar un método de acetato de litio.

Para ser más específicos, en la transformación de una bacteria del género *Escherichia*, la misma puede llevarse a cabo mediante los métodos descritos en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 69, 2110 (1972), *Gene*, volumen 17, 107 (1982), etc.

En la transformación de una bacteria del género *Bacillus*, la misma puede llevarse a cabo mediante los métodos descritos en *Molecular & General Genetics*, volumen 168, 11 (1979), etc.

En la transformación de levadura, la misma puede llevarse a cabo mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, volumen 194, 182-187 (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 75, 1929 (1978), etc.

En la presente invención, la célula transformada mencionada anteriormente se cultiva usualmente en condiciones tales que el gen de las enzimas que participan en la síntesis de THBP tales como GCH, PTPS y SPR introducido en ella es capaz de expresarse. En el cultivo se prefiere que la temperatura de incubación, el pH del medio y el nivel de oxígeno disuelto se controlen constantemente. Esto se debe a que, con el fin de suprimir una reducción del crecimiento de la célula, por ejemplo, disminuyendo lo más posible el pH del medio, para promover el crecimiento y también para producir el compuesto de bipterina más eficazmente, se prefiere hacer que las condiciones del cultivo sean constantes como se mencionó anteriormente.

En el cultivo de una célula transformada en donde la célula huésped es una bacteria del género *Escherichia* o una bacteria del género *Bacillus* se prefiere un medio líquido como medio utilizado para el cultivo, en particular un medio que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, material inorgánico y otros elementos necesarios para el crecimiento de dicha célula transformada. Ejemplos de fuente de carbono son glucosa, dextrina, almidón soluble y sacarosa; ejemplos de fuente de nitrógeno son sal de amonio, nitrato, licor de maíz fermentado, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soya y extracto de patata y otras sustancias inorgánicas u orgánicas; y ejemplos de material inorgánico son cloruro de calcio, fosfato diácido de sodio y cloruro de magnesio. También pueden agregarse al medio precedente extracto de levadura, vitaminas, factor promotor del crecimiento, etc. Preferiblemente, el pH del medio es de aproximadamente 5 a 8.

Con respecto al medio para el cultivo de una bacteria del género *Escherichia*, ejemplos específicos son medio M9 que contiene glucosa y ácido casamino (Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972), etc. y se prefiere que, luego de un cultivo previo mediante la utilización de un medio LB (remitirse al Ejemplo 4), se lleve a cabo un cultivo principal mediante la utilización de un medio NUCA (remitirse al Ejemplo 4). Aquí, con el fin de que un promotor actúe eficazmente, puede agregarse un reactivo tal como ácido 3 β -indolilacrílico o cloranfenicol si es necesario. Cuando se utiliza un promotor de inducción se prefiere agregar una sustancia que provoque la inducción al medio. Por ejemplo, en el caso del promotor lac, se prefiere agregar β -tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) y, en el caso del promotor GAL, se prefiere agregar galactosa. El cultivo se lleva a cabo preferiblemente a aproximadamente 10 a 50°C durante aproximadamente 3 a 72 horas y, si se desea, puede someterse a aireación o mezclado.

El cultivo de una bacteria del género *Bacillus* usualmente se lleva a cabo a aproximadamente 30 a 40°C durante aproximadamente 6 a 40 horas y, si se desea, puede someterse a aireación o mezclado. Con respecto al medio, pueden utilizarse medios conocidos. Para ser más específicos, se prefiere que, por ejemplo, se realice un cultivo previo mediante la utilización de un medio LB (remitirse al Ejemplo 4) y luego se lleve a cabo un cultivo principal mediante la utilización de un medio NU (remitirse al Ejemplo 14).

Con respecto al medio para el cultivo de levadura, puede ejemplificarse un medio mínimo de Burkholder [Bostian, K. L., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 77, 4505 (1980)] y un medio SD que contiene 0,5% de ácido casamino (Bitter, G. A., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 81, 5330 (1984)]. De entre ellos, se prefiere un medio SD-Ura⁻ (remitirse al Ejemplo 5). Se prefiere que el pH del medio se ajuste a aproximadamente 5-8. El cultivo preferiblemente se lleva a cabo a aproximadamente 20-40°C durante aproximadamente 24-84 horas y, si se desea, puede someterse a aireación o mezclado.

A continuación se mencionarán realizaciones preferidas del método de fabricación para el compuesto de bipterina de acuerdo con la presente invención.

El pSTV28 se utiliza como vector de un tipo de *Escherichia coli* y se prepara pSTV28-GPS, que es un plásmido en el que se alinea ADNc de cada una de GCH, PTPS y SPR corriente abajo de un promotor de lactosa. Dicho plásmido es un vector de expresión en el que es posible una inducción por parte de IPTG. El vector de expresión se introduce en una cepa JM 101 de *Escherichia coli* y se cultiva en un medio que contiene IPTG 0,5 mM durante aproximadamente 48 horas, con lo cual puede fabricarse el compuesto de bipterina.

De manera alternativa se utiliza pYES2 de levadura como vector y se prepara pYES2-FPS, que es un plásmido en el que se alinea ADNc de cada una de GCH, PTPS y SPR corriente abajo de un promotor GAL1. Dicho plásmido es un vector de expresión en el que es posible una inducción de la expresión por parte de la galactosa. El vector de expresión se introduce en levadura *Saccharomyces* y la expresión de cada gen de enzima se lleva a cabo con galactosa, con lo cual puede fabricarse el compuesto de bipterina.

También existe la siguiente realización como método para la fabricación del compuesto de bipterina de acuerdo con la presente invención. De este modo, se introduce un vector lanzadera pDG148 (Karmazyn-Campelli, *et al., Cell*, 52, 697-704, 1988) y se prepara pDG148MPS, que es un plásmido en el que se alinea ADNc de cada una de GCH, PTPS y SPR corriente abajo de un promotor spac. Dicho plásmido es un plásmido de expresión para *Bacillus subtilis* que es capaz de ser inducido por IPTG. El vector de expresión se introduce en la cepa 1A1 de *Bacillus subtilis* (*trpC2*) para preparar una célula transformada. Dicha célula transformada se cultiva previamente en medio LB que contiene aproximadamente 5 μ g/ml de kanamicina durante aproximadamente 3 horas y luego se somete a un cultivo de agitación en un medio NU que contiene aproximadamente 1 mM de IPTG y aproximadamente 5 μ g/ml de kanamicina a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 20 horas, con lo cual puede fabricarse el compuesto de bipterina.

Cuando el gen *lacI* se elimina del vector lanzadera pDG148 mencionado anteriormente, también es posible preparar un vector de expresión pDG148MPSΔI, que siempre es capaz de expresar GCH, PTPS y SPR, independientemente de la presencia o ausencia de IPTG. Dicho vector de expresión puede utilizarse de la misma manera que se explicó anteriormente, excepto que la IPTG no es necesaria durante el cultivo principal.

La THBP es producida a partir de la GTP, que se encuentra inherentemente presente en la célula huésped, por la enzima que es capaz de participar en la síntesis de THBP, tal como GCH, PTPS o SPR, expresada en la célula transformada. La THBP producida se oxida y convierte en DHBP como se muestra en la Fig. 2 y luego se oxida adicionalmente y se convierte en BP en la célula o luego de salir de la célula al pasar a través de la membrana celular en un medio tal como un caldo de cultivo (Takikawa, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 161:295-302, 1986). De este modo, aunque no es posible llegar a una conclusión general a causa de la diferencia ocasionada por el tipo de célula transformada y el entorno extracelular, como las condiciones de cultivo, en algunos casos solo se produce THBP en la célula transformada mientras que, en otros casos, una parte o la totalidad de la misma se oxida y la DHBP o BP o una mezcla de las mismas se encuentra disponible. También existe otro caso, en el que la THBP producida en la célula transformada pasa a través de la membrana celular y sale de la célula. En ese caso, aunque no es posible llegar a una conclusión general a causa de la diferencia ocasionada por la composición del medio de cultivo, en ocasiones la THBP saliente se oxida para producir DHBP o BP en el medio de cultivo.

En la presente invención, el compuesto de biopterina en el caldo de cultivo o en la sustancia tratada del mismo tal como un sobrenadante puede purificarse y separarse mediante el siguiente método. Si se desea, el caldo de cultivo o la sustancia tratada del mismo como un sobrenadante se oxida, por ejemplo, mediante la adición de un agente de oxidación a la misma y, posteriormente, el compuesto de biopterina se purifica y separa. Dado que la THBP es una sustancia fácilmente oxidable de entre los compuestos de biopterina, se prefiere que el caldo de cultivo o la sustancia tratada del mismo tal como un sobrenadante se oxide de forma tal que la THBP o la DHBP se oxide y convierta en BP y, posteriormente, se purifique y separe una BP químicamente más estable.

Con respecto a un método para la oxidación del compuesto de biopterina en el caldo de cultivo o en la sustancia tratada del mismo tal como un sobrenadante, puede utilizarse un método conocido y puede agregarse un agente de oxidación conocido al caldo de cultivo o a la sustancia tratada del mismo tal como un sobrenadante. Ejemplos del agente de oxidación son peryodato tal como yoduro de potasio, dicromato de potasio o sodio, permanganato de potasio, nitrosodisulfonato de potasio y ácido nítrico y, de entre ellos, se prefiere utilizar el yoduro de potasio.

Para separar y purificar el compuesto de biopterina de la presente invención del producto de cultivo precedente pueden utilizarse métodos conocidos.

Para ser más específicos, puede utilizarse adecuadamente, por ejemplo, un método en el cual el cuerpo o célula de un hongo puede recolectarse mediante un método conocido luego del cultivo en la extracción del compuesto de biopterina de la presente invención de cuerpo o célula de hongo cultivados que es célula transformada y se suspende en un tampón apropiado y luego se somete a un tratamiento con onda ultrasónica o lisozima o congelación-fusión y un método en el cual el cuerpo o célula del hongo se destruye mediante una combinación de dichos medios, luego la célula transformada y el sobrenadante del caldo de cultivo se separan por medios conocidos como centrifugación o filtración y se recolecta el sobrenadante de donde se obtiene una solución en la que el compuesto de biopterina de la presente invención está disuelto.

Cuando la THBP producida en la célula transformada sale de la misma al pasar por la membrana celular puede utilizarse de forma apropiada, por ejemplo, un método en el cual la célula transformada y el sobrenadante se separan por medios conocidos tales como centrifugación o filtración sin destruir la célula transformada y se recolecta el sobrenadante de donde se obtiene una solución en la que el compuesto de biopterina de la presente invención está disuelto.

La purificación del compuesto de biopterina de la presente invención que se encuentra en el caldo de cultivo o el producto tratado del mismo como el sobrenadante preparado de esta forma puede llevarse a cabo mediante una combinación apropiada de métodos de separación y purificación que son conocidos.

Con respecto a dichos métodos conocidos para la separación y purificación, puede utilizarse un método en el cual se utiliza la solubilidad tal como precipitación por salado y precipitación con disolventes, un método en el cual se utiliza principalmente la diferencia de pesos moleculares tal como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS; un método en el cual se utiliza la diferencia de cargas tal como la cromatografía de intercambio iónico; un método en el cual se utiliza la afinidad específica tal como cromatografía de afinidad; un método en el cual se utiliza la diferencia de hidrofobicidad tal como una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa; un método en el cual se utiliza un punto isoeléctrico tal como isoelectroenfoque; y similares.

Cuando el compuesto de biopterina de la presente invención obtenido de esta forma se obtiene en una forma libre, el mismo puede convertirse en una sal mediante un método conocido o mediante un método similar y, por el contrario, cuando se obtiene en forma de sal, el mismo puede convertirse en una sustancia libre u otra sal mediante un método conocido o mediante un método similar.

La realización preferida de purificación del compuesto de biopterina de la presente invención es un método en el cual el caldo de cultivo se oxida con una solución de yoduro de potasio en una condición ácida para convertir en BP y luego se obtiene BP pura mediante una operación de precipitado, cromatografía en Dowex 1 x 8 y cromatografía en Florisil.

El compuesto de biopterina obtenido de esta forma es capaz de convertirse en THBP, si se desea, utilizando medios conocidos. Por ejemplo, la BP o DHBP puede convertirse en THBP mediante una reacción de hidrogenación química. En la reacción de hidrogenación química puede utilizarse un método conocido y puede ejemplificarse un método en el cual la reacción se lleva a cabo con hidruro de aluminio y litio, trietilhidruro de boro y litio, borohidruro de sodio, diborano, diborano de alquilo, etc. y un método en el cual la reducción se lleva a cabo utilizando catalizador de níquel Raney. Las condiciones de reacción pueden ser la de los métodos conocidos. En algunas condiciones de reducción también es posible obtener DHBP a partir de BP.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que la THBP es una coenzima para distintos tipos de enzimas y es una sustancia que se espera que tenga dicha acción farmacológica. Además, la DHBP o la BP no son útiles para proporcionar THBP, sino que también son sustancias útiles con la posibilidad de exhibir una acción farmacológica.

Ejemplos

A continuación se ilustrarán los Ejemplos de la presente invención. A propósito, los siguientes procedimientos básicos de ingeniería genética o ingeniería biológica se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos mencionados en "Molecular Cloning" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982); "Molecular Cloning" 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); *Methods in Enzymol.*, volumen 194 (1991); *Jikken Igaku* (Supplementary Issue), *Kobo ni yoru Idenshi Jikkenho* (Methods for Genetic Experiments Using Enzymes), Yodosha (1994); etc. Cuando se utilizó un kit de venta en el mercado se siguieron las instrucciones adjuntas al mismo.

Ejemplo 1

Preparación de gen de GCH, gen de PTPS y gen de SPR

1. Clonación del gen de GCH (GTP ciclohidrolasa I) derivado de *Escherichia coli*

Se extrajo ADN genómico de *Escherichia coli* (cepa W3110) mediante un método descrito (*Seibutsu Kogaku Jikkensho* [publicado por Baifukan, páginas 97-98]). Este se utilizó como molde y se llevó a cabo una PCR de forma convencional mediante el uso del cebador sentido P1 (SEQ ID NO: 1) y el cebador antisentido P2 (SEQ ID NO: 2) para preparar gen de GCH (folE) [Katzenmeier, G., et al., *Bio Chem Hoppe Seyler* 372:991-997, 1991, [GenBank X63910]]. Posteriormente se utilizó ADN que contenía el gen de GCH resultante como molde y se llevó a cabo una PCR utilizando el cebador sentido P3 (SEQ ID NO: 3) y el cebador antisentido P4 (SEQ ID NO: 4) para agregar sitios de escisión para las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI* a las regiones sin traducir del extremo 5' y el extremo 3' del gen de GCH, respectivamente. Este producto de la PCR fue digerido por *EcoRI* y *SpeI* y se introdujo en los sitios de *EcoRI* y *SpeI* del vector de pProEX HTa (GIBCO BRL) para preparar pProEX-GCH. A propósito, las condiciones de la PCR, el tratamiento con las enzimas de restricción y la reacción de ligación se llevaron a cabo de acuerdo con métodos convencionales.

Posteriormente, se realizó una PCR mediante la utilización de pProEX-GCH como molde y del cebador sentido P5 (SEQ ID NO: 5) y el cebador antisentido P6 (SEQ ID NO: 6) para clonar el gen de GCH de *Escherichia coli* que se clonó en pProEX-GCH en un plásmido pSTV28 (Takara Shuzo) para preparar un gen de GCH que tuviera sitios de escisión para las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de la PCR resultante fue escindido por las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI* y se conectó a fragmentos de *EcoRI* y *SalI* (3,0 kb) de pSTV28 (de ahora en adelante, denominados fragmento *EcoRI-SalI* o fragmento *EcoRI,SalI*; esto se aplicará también en otros casos) para proporcionar el plásmido de expresión pSTV28-GCH de GCH de *Escherichia coli* (Fig. 3). El gen de GCH (folE) que se encontraba en pSTV28-GCH se transcribió con el promotor de lactosa (lac) de *Escherichia coli* y la GCH así expresada tuvo una secuencia de aminoácidos en la cual 7 aminoácidos (parte subrayada en la Fig. 10) derivados de pSTV28 se agregaron al extremo amino (Fig. 10).

2. Clonación de gen de PTPS (6-piruviltetrahidropterinasintasa) derivado de rata

Se trató hígado extirpado de rata con collagenasa y la célula hepática resultante se trató con un reactivo TRIzol (GIBCO BRL) para extraer ARN total. El ARN total de hepatocito de rata tratado con DNasa se sometió a una RT-PCR mediante la utilización del kit SuperScript Preamplification System (GIBCO BRL) para preparar ADNc que contenía gen de PTPS (Inoue, Y., et al., *J. Biol. Chem.* 266:20791-20796, 1991: [GenBank NM_017220]). Aquí se utilizó cebador oligo dT para la transcripción inversa mientras que, para la amplificación de un ADN de cadena simple que contenía gen de PTPS por PCR, se utilizaron el cebador sentido P7 (SEQ ID NO: 7) y el cebador antisentido P8. (SEQ ID NO: 8). Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del ADNc resultante que contenía PTPS como molde y del cebador sentido P9 (SEQ ID NO: 9) y el cebador antisentido P10 (SEQ ID NO: 10) para agregar los sitios

de escisión para las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI* a las regiones sin traducir en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente, de ADNc que contenía gen de PTPS. El producto de la PCR fue digerido por *EcoRI* y *SpeI* para insertarse en los sitios de *EcoRI* y *SpeI* del vector pProEX HTc (GIBCO BRL), luego de lo cual se preparó pProEX-PTPS (Fig. 4).

Posteriormente se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de pProEX-PTPS como molde y el cebador sentido P11 (SEQ ID NO: 11) y el cebador antisentido P12 (SEQ ID NO: 12) para proporcionar el gen de PTPS que tenía los sitios de escisión para las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall*. El producto de la PCR resultante fue escindido por las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall* y se conectó a un fragmento de *EcoRI* y *Sall* (2,7 kb) de pUC18 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. *Gene*, 33:103-119, 1985) para proporcionar el plásmido de expresión pUC18-PTPS de PTPS de rata (Fig. 4). El gen de PTPS que se encontraba en pUC18-PTPS se transcribió con el promotor lac de *Escherichia coli* y la PTPS expresada tuvo una secuencia de aminoácidos en la cual 7 aminoácidos (parte subrayada en la Fig. 11) derivados de pUC18 se agregaron al extremo amino (Fig. 11).

3. Clonación de gen de SPR (*sepiapterina reductasa*) derivado de rata

De acuerdo con el mismo método utilizado en el caso del ADNc que contenía gen de PTPS, se preparó ADNc que contenía gen de SPR (Citron, B. A., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6436-6440, 1990, [GenBank M36410] con la excepción de que se utilizaron el cebador sentido P13 (SEQ ID NO: 13) y el cebador antisentido P14 (SEQ ID NO: 14) para la amplificación de ADN de cadena simple que contenía gen de SPR mediante una PCR. El ADNc que contenía el gen de SPR se utilizó como molde y se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del cebador sentido P15 (SEQ ID NO: 15) y el cebador antisentido P16 (SEQ ID NO: 16) para agregar los sitios de escisión para las enzimas de restricción *BamHI* y *SpeI* a las regiones sin traducir del extremo 5' y el extremo 3', respectivamente, del ADNc que contenía el gen de SPR. El producto de la PCR fue digerido por *BamHI* y *SpeI* y se insertó en los sitios de *BamHI* y *SpeI* del vector de pProEX HTb (GIBCO BRL) para preparar pProEX-SPR (Fig. 5).

Posteriormente, se realizó una PCR para gen de SPR de rata mediante la utilización de pProEX-SPR como molde y del cebador sentido P17 (SEQ ID NO: 17) y el cebador antisentido P18 (SEQ ID NO: 18) para preparar gen de SPR que tenía los sitios de escisión para una enzima de restricción *HindIII* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y el producto de la PCR resultante fue escindido por una enzima de restricción *HindIII* y se conectó al fragmento *HindIII* (2,7 kb) de pUC19 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. *Gene*, 33:103-119, 1985) para preparar un plásmido de expresión pUC19-SPR de SPR de rata (Fig. 5). Con respecto al gen de SPR codificado para pUC19-SPR, el mismo también se transcribió con el promotor lac de *Escherichia coli* y la SPR expresada tuvo una secuencia de aminoácidos en la cual 8 aminoácidos (parte subrayada en la Fig. 12) derivados de pUC19 se agregaron al extremo amino (Fig. 12).

4. Clonación de gen de GCH (*FOL 2*) derivado de levadura

El FOL2 es un homólogo de la GCH. Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de ADN genómico de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa KA31) como molde y el cebador sentido P23 (SEQ ID NO: 23) y el cebador antisentido P24 (SEQ ID NO: 24) para proporcionar ADN que contenía gen FOL2 (Tettelin, H., *et al. Nature* 387:81-84, 1997, [GenBank NC_001139]) que tenía sitios de escisión para las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* de la región sin traducir en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente. El producto de la PCR fue digerido por *BamHI* y *XhoI* y se insertó en los sitios de *BamHI* y *XhoI* del vector pYES2/CT (Invitrogen) para preparar pYES2-FOL2 (Fig. 6).

Ejemplo 2

Preparación del plásmido pSTV28-GPS que produce el compuesto de biopterina para *Escherichia coli*

Se preparó pSTV28-GPS, que es un plásmido de expresión de la THBP sintasa para *Escherichia coli* mediante el siguiente método. En primer lugar, se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del pUC18-PTPS mencionado en el Ejemplo 1 como molde para amplificar ADN que contenía desde el promotor lac hasta el codón de terminación del gen de PTPS. Al diseñar el cebador para la PCR se proporcionó el sitio *Sall* al cebador sentido, mientras que se proporcionó el sitio de *BamHI* al cebador antisentido de forma de simplificar la clonación posterior. Dichos cebadores tuvieron secuencias de cebador sentido P19 (SEQ ID NO: 19) y cebador antisentido P20 (SEQ ID NO: 20), respectivamente. El producto de la PCR resultante se sometió a un tratamiento de precipitación con etanol, se disolvió en un tampón de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM) y se escindió con las enzimas de restricción *Sall* y *BamHI*.

Posteriormente, se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del pUC19-SPR mencionado en el Ejemplo 1 como molde para amplificar el ADN que contenía del promotor lac al codón de terminación del gen de SPR. En los cebadores para la PCR se proporcionó el sitio de *BamHI* al cebador sentido mientras que se proporcionó el sitio de *SphI* al cebador antisentido. Dichos cebadores tuvieron una secuencia de cebador sentido P21 (SEQ ID NO: 21) y una de cebador antisentido P22 (SEQ ID NO: 22), respectivamente. El producto de la PCR resultante se sometió a un tratamiento de precipitación con etanol, se disolvió en un tampón de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM) y se escindió con las enzimas de restricción *BamHI* y *SphI*.

ES 2 320 531 T3

El fragmento *SaII-BamHI* que contenía el gen de PTPS y el fragmento *BamHI-SphI* que contenía el gen de SPR preparados se conectaron al producto digerido (3,9 kb) de pSTV28-GCH mediante *XhoI* y *SphI* para preparar pSTV28GPS (Fig. 7). El pSTV28-GPS tiene una estructura en la que cada uno de los genes de GCH, PTPS y SPR (descritos en la Fig. 10 a la Fig. 12) es transcrito por el promotor lac.

Ejemplo 3

Preparación de pYES2-FPS, un plásmido que produce el compuesto de biopterina para levadura

Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del cebador sentido P25 (SEQ ID NO: 25) y el cebador antisentido P26 (SEQ ID NO: 26), en la que se utilizó pUC18-PTPS como molde para agregar los sitios de escisión para las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* a la región sin traducir en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente, del gen de PTPS. El producto de la PCR fue digerido por *BamHI* y *XhoI* y se insertó en los sitios de *BamHI* y *XhoI* del vector pYES2/CT para preparar pYES2-PTPS (Fig. 8).

Posteriormente se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del cebador sentido P27 (SEQ ID NO: 27) y el cebador antisentido P28 (SEQ ID NO: 28), en donde se utilizó pUC19-SPR como molde para preparar ADNc que contenía gen de SPR que tenía los sitios de escisión para las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* en la región sin traducir en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente, del gen de SPR. El producto de la PCR fue digerido por *BamHI* y *XhoI* y se insertó en los sitios de *BamHI* y *XhoI* del vector pYES2/CT (Invitrogen) para preparar pYES2-SPR (Fig. 8).

Luego se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del cebador sentido P29 (SEQ ID NO: 29) y el cebador antisentido P30 (SEQ ID NO: 30), en donde se utilizó pYES2-PTPS como molde para preparar un fragmento de ADN que tenía el promotor GAL1 al cual se agregó el sitio de escisión para *SphI* corriente arriba del gen de PTPS y la señal de terminación de la transcripción de CYC1 a la cual se agregó el sitio de escisión para *SpeI* corriente abajo. A propósito, este fragmento de ADN tiene extremos romos debido a la propiedad de la ADN polimerasa (ADN polimerasa Pyrobest [Takara Shuzo]) utilizada aquí. Dicho fragmento de ADN en el que el extremo 5' estaba fosforilado se insertó en pYES2-SPR, en donde sus extremos quedaron romos luego de ser digeridos por *SpeI* para preparar pYES2-PS. Posteriormente se llevó a cabo una PCR mediante la utilización del cebador sentido P31 (SEQ ID NO: 31) y el cebador antisentido P32 (SEQ ID NO: 32), en donde se utilizó pYES2-FOL2 como molde para preparar un fragmento de ADN que tenía el promotor GAL1 al cual se agregaron los sitios de escisión para *SpeI* corriente arriba del gen FOL2 y la señal de terminación de la transcripción de CYC1 a la cual se agregó el sitio de escisión para *SpeI* corriente abajo. El fragmento fue digerido por *SpeI* y se insertó en el sitio de escisión para *SpeI* de pYES2-PS para preparar pYES2-FPS. En el pYES2-FPS tuvo una estructura en la cual el gen de GCH derivado de *S. cerevisiae*, el gen de PTPS derivado de rata y el gen de SPR derivado de rata es transcrito por el promotor GAL1 y se expresa la enzima que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la enzima de un tipo natural (Fig. 9).

Ejemplo 4

Producción del compuesto de biopterina por parte de Escherichia coli

La cepa JM101 de *Escherichia coli* se transformó mediante la utilización de pSTV28-GPS con un método de cloruro de calcio (Mandel y Higa, *J. Mol. Biol.*, 53, 159-162, 1970) y el JM101/pSTV28-GPS resultante se cultivó para investigar su capacidad de producción del compuesto de biopterina. En primer lugar se utilizó JM101/pSTV28-GPS cultivado durante una noche en un medio LB como caldo de cultivo previo, del cual se inocularon 50 μ l en 3 mL de un medio NUCA que contenía IPTG (tiogalactopiranosida de isopropilo) 0,5 mM y se cultivó a 37°C durante 48 horas. A propósito, el medio LB y el medio NUCA tenían las siguientes composiciones. Composición en 1 L del medio LB: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Composición en 1 L de medio NUCA: 20 g de glicerol, 4 g de extracto de levadura, 10 g de ácido casamino, 4 g de K_2HPO_4 , 4 g de KH_2PO_4 , 2,7 g de Na_2HPO_4 , 1,2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de NH_4Cl , 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $MnSO_4 \cdot nH_2O$, 10 mg de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 4 mg de $COCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 mg de $CUCl_2 \cdot 7H_2O$, 0,5 mg de H_3BO_4 y 30 mg de cloranfenicol.

La THBP resultante se oxida fácilmente en su solución acuosa para proporcionar DHBP y BP y, con el fin de verificar si el JM101/pSTV28-GPS produjo la THBP, el caldo de cultivo se sometió a una oxidación de yodo para convertir en BP y se midió la cantidad así producida. El caldo de cultivo se centrifugó para retirar las células, se agregó una décima en volumen de solución de yoduro de potasio (solución de ácido clorhídrico 1N que contenía 0,9% de I_2 y 1,88 de KI) al caldo de cultivo y la mezcla se dejó en reposo durante 1 hora protegida de la luz. Luego este caldo de cultivo se diluyó 20 veces en su concentración con agua desionizada, se inyectó a una columna de fase inversa C18 (COSMOSIL 5C18-AR, Nakarai Tesk) de 4,6 mm x 250 mm equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM con una tasa de flujo de 0,8 mL/minuto y se cuantificó la BP mediante excitación a 350 nm con el uso de un detector fluorescente a 440 nm. Como resultado, se detectaron picos correspondientes a espécimen de BP estándar y a espécimen de P (pteridina) estándar en el sobrenadante (Fig. 13), con lo cual fue evidente que el JM101/pSTV28-GPS produjo el compuesto de biopterina. Cuando se calculó la cantidad del compuesto de biopterina a partir de las áreas de los picos, la cantidad de producción por litro de caldo de cultivo fue de aproximadamente 20 mg.

Ejemplo 5

Producción del compuesto de biopterina a partir de levadura

5 Se transformó la cepa KA31 de *S. cerevisiae* (MAT_{ura3} leu2 his3 trp1) con un método de acetato de litio mediante la utilización de pYES2-FPS. La célula transformada fue seleccionada por un medio SD-Ura⁻ para proporcionar una cepa FPS. [Composición en un litro del medio SD-Ura⁻: 20 g de glucosa, 1,7 g de base nitrogenada de levadura (que no contenía ni aminoácido ni sulfato de amonio), 5 g de sulfato de amonio, 20 mg de sulfato de adenina, 20 mg de Arg, 100 mg de Asp, 100 mg de Glu, 30 mg de Ile, 30 mg de Lys, 20 mg de Met, 50 mg de Phe, 400 mg de Ser, 200 mg de Thr, 30 mg de Tyr, 150 mg de Val, 20 mg de His, 100 mg de Leu y 20 mg de Trp].

Asimismo se preparó una célula transformada con el vector (pYES2/CT) como testigo.

15 La célula transformada resultante se cultivó en 5 ml de medio SCD-Ura⁻ hasta que la OD_{600 nm} se volvió 0,4 y, posteriormente, se substituyó con la misma cantidad de un medio SCGal-Ura⁻ para realizar la inducción de la expresión. A propósito, la temperatura de incubación se llevó a 30°C.

Composición en 1 litro de medio SCD-Ura⁻: 1,7 g de base de nitrógeno de levadura (que no contenía ni aminoácido ni sulfato de amonio), 5 g de sulfato de amonio, 5 g de ácido casamino, 20 g de glucosa, 20 mg de sulfato de adenina y 20 mg de Trp.

Composición en 1 litro de medio SCGal-Ura⁻: 1,7 g de base de nitrógeno de levadura (que no contenía ni aminoácido ni sulfato de amonio), 5 g de sulfato de amonio, 5 g de ácido casamino, 20 g de galactosa, 20 mg de sulfato de adenina y 20 mg de Trp.

25 Veinticuatro horas después de la inducción de la expresión se apreció una coloración amarilla específica del compuesto de pteridina en el caldo de cultivo de la cepa FPS, con lo que se notó, dada su apariencia, que los tres tipos de enzimas expresadas funcionaron en las células.

30 El crecimiento de las células luego de la inducción fue bueno tanto en la cepa FPS como en la cepa testigo (Fig. 14). Para confirmar la producción de THBP o de su producto oxidado, el sobrenadante del cultivo se oxidó 72 horas luego de la inducción al igual que en el Ejemplo 4 y se sometió a análisis por HPLC y análisis por TLC.

A propósito, el análisis por HPLC se llevó a cabo mediante el mismo método que en el Ejemplo 4. En el análisis por TLC se utilizó una placa de capa fina de gel de sílice para cromatografía en capa fina (gel de sílice 60 F₂₅₄; espesor de la capa: 0,25 mm; 10 cm x 20 cm) y, en cuanto al disolvente para revelado, se utilizó una mezcla de cloroformo, metanol, ácido acético y agua (45:10:5:2). La muestra (20 µl) y cada 100 ng de los especímenes de BP y P estándar se observaron sobre la placa de capa fina, se secaron con aire y se revelaron mediante un método ascendente inclinado. Cuando la distancia revelada llegó a aproximadamente 12 cm concluyó el revelado, la placa de capa fina se secó con aire y se irradió con rayos ultravioletas (longitud de onda principal: 254 nm) y se detectó la mancha de absorción.

El resultado del análisis por HPLC se muestra en la Fig. 15. Solamente en la cepa FPS se notó el pico correspondiente a la BP y, a partir de la relación de área de las áreas de los picos, se encontró que la cepa FPS produjo el compuesto de biopterina correspondiente a 0,76 µg/ml de BP mediante inducción durante 72 horas en el sobrenadante del cultivo.

La Fig. 16 muestra el resultado del análisis por TLC del sobrenadante del cultivo. En el sobrenadante del cultivo de la cepa FPS se confirmó una mancha que mostraba la misma movilidad que el espécimen de BP estándar. En el análisis por TLC se encontró que, cuando se analizaron 20 µl del sobrenadante del cultivo oxidado con yoduro de potasio tal como se mencionó en el Ejemplo 5, se produjeron 1,37 µg de BP por 20 µl de sobrenadante del cultivo según el cálculo a partir de la intensidad de la absorción ultravioleta de la mancha de la BP y este valor es idéntico al valor calculado a partir del resultado del análisis por HPLC, que fue de 0,76 µg por ml del sobrenadante del cultivo.

55 Ejemplo 6

Preparación de Escherichia coli que produce el compuesto de biopterina

Para preparar una bacteria huésped capaz de producir GTP, que es un precursor de la THBP, en cantidades mayores que el tipo salvaje se preparó un mutante regulador para la síntesis de purina como se indica a continuación.

En primer lugar, en un medio mínimo de agar-agar M9 que contenía 20, 50, 100 y 500 µg/ml de 8-azaguanina y decoinina, se evaluó la sensibilidad de estas sustancias a la cepa JM101 de *Escherichia coli* y fue evidente que la sensibilidad se encontraba disponible a 100 µg/ml o más de 8-azaguanina y a 500 µg/ml o más de decoinina.

65 Composición del medio mínimo de agar-agar M9: 2 g/L de glucosa, 6 g/L de Na₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de NaCl, 1 g/L de NH₄Cl, 2 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂ y 15 g/L de agar-agar; pH 7.4.

ES 2 320 531 T3

Posteriormente, la cepa JM101 de *Escherichia coli*, que fue mutada por N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina (Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), se sembró en una placa de medio mínimo de agar-agar M9 que contenía 100 µg/ml de 8-azaguanina o 500 µg/ml de decoinina y se incubó a 37°C para proporcionar un mutante resistente. Se seleccionaron 50 cepas de cada una de las cepas mutantes resistentes, a las que se les introdujo el plásmido de expresión pSTV28-GPS mediante un método de cloruro de calcio. La cepa preparada de esta forma se cultivó durante 48 horas en el medio NUCA mencionado anteriormente y se comparó la cantidad de compuesto de biopterina producida por cada cepa.

Como resultado, entre las cepas resistentes a la 8-azaguanina, se obtuvo una cepa AG14/pSTV28-GPS que tenía una productividad del compuesto de biopterina aproximadamente 10 veces mayor en comparación con la cepa original (JM101/pSTV28-GPS). De este modo, fue evidente que, cuando se confiere resistencia a la 8-azaguanina a *Escherichia coli*, es posible preparar una cepa en la que aumenta la productividad del compuesto de biopterina (Tabla 1). A propósito, fue evidente, con respecto a esta cepa, que se detectó DHBP además de BP en el caldo de cultivo y que una parte de la THBP producida se oxidó naturalmente y se encontraba presente en forma de DHBP o BP (Fig. 17).

Ejemplo 7

Cultivo de Escherichia coli que produce el compuesto de biopterina mediante la utilización de un fermentador de tanque y purificación de BP

Se cultivó una cepa AG14/pSTV28-GPS de bacteria capaz de producir el compuesto de biopterina mediante la utilización de un fermentador de tanque de 3 litros. Como medio para el fermentador de tanque se utilizó el medio NUCA mencionado anteriormente, el cual contenía 0,5 mM de IPTG. En primer lugar, la cepa AG14/pSTV28-GPS se cultivó en un medio LB durante una noche y 10 ml del mismo se inocularon en 2 L de medio NUCA que contenía 0,5 mM de IPTG y se cultivaron a 37°C mientras el nivel de oxígeno disuelto se mantuvo en 30%. Una vez consumido el 2% de glicerol agregado en la etapa inicial del cultivo se agregó sucesivamente 80% de glicerol y el cultivo se llevó a cabo durante 48 horas.

Se llevó a cabo un análisis por HPLC para una parte del caldo de cultivo. Así, la THBP producida se convirtió mediante oxidación con solución de yoduro de potasio como en el Ejemplo 4 y se llevó a cabo un análisis fluorescente por HPLC. La HPLC se llevó a cabo al igual que en el Ejemplo 5. El resultado fue que, cuando se determinó a partir de la cantidad de BP producida calculada a partir del área de pico, se encontró que 350 mg/L de la THBP fueron producidos por el cultivo durante 48 horas.

Con el fin de obtener la BP del caldo de cultivo resultante, se centrifugaron 200 ml del caldo de cultivo precedente para retirar las células y se agregó un décimo de solución de yoduro de potasio (solución de ácido clorhídrico 1N que contenía 0,9% de I₂ y 1,8% de KI) al sobrenadante de forma de oxidar y obtener la BP. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar durante 1 hora protegida de la luz y se ajustó a pH 7,0 mediante la adición de solución acuosa 5M de hidróxido de sodio a la misma. Luego la solución se enfrió con hielo para separar y hacer precipitar la BP, el precipitado resultante se recuperó mediante centrifugación, se le agregó agua pura y la mezcla se ajustó a pH 2 con ácido clorhídrico, con lo que el precipitado se disolvió. Esta solución se cargó en una columna de Dowex 1 x 8 (10 mm x 100 mm), se lavó con 20 ml de agua pura y se eluyó con NaCl 0,5 M con una tasa de flujo de 1 ml/minuto. Se recogió cada fracción de 2 ml del eluido resultante y se agruparon de la 8ª a la 16ª fracción. La mitad de las fracciones agrupadas se cargó en una columna (10 mm x 100 mm) de Florisil equilibrada con ácido fórmico 0,5 M, se lavó con 20 ml de ácido fórmico 0,5 M y se eluyó con HCl 2 N. Se recogió cada fracción de 1,8 ml del eluido resultante y se agruparon de la 4ª a la 16ª fracción, con lo que se obtuvieron 2 mg de BP con una pureza del 98%.

Ejemplo 8

Optimización de las condiciones del cultivo y aumento de la cantidad producida del compuesto de biopterina

En el cultivo en el que se utilizó el fermentador de tanque de tres litros mencionado en el Ejemplo 17, el cultivo se llevó a cabo de forma tal que la temperatura de incubación, el pH del medio y el nivel de oxígeno disuelto se controlaron y mantuvieron en valores predeterminados. Dichas condiciones son las siguientes:

- (1) La temperatura de cultivo es 37°C.
- (2) El valor del pH es 6,5.
- (3) El nivel de oxígeno disuelto es 30%.

El pH del medio se controló mediante la adición de 28% de amoníaco acuoso, mientras que el nivel de oxígeno disuelto se controló mediante un aumento de las revoluciones al mezclar. Con respecto al glicerol, que es una fuente de carbono, se agregó 2% al comienzo del cultivo y, luego de consumirse, se agregó 80% de glicerol constantemente

ES 2 320 531 T3

con una tasa de flujo de 10 ml/hora. Como resultado, se encontró que se produjeron 2 g/L de THBP al cultivar durante 48 horas cuando se determinó a partir de la cantidad producida de BP calculada a partir del área de pico del análisis de la HPLC (Fig.18).

5 Ejemplo 9

Aumento de la cantidad producida del compuesto de biopterina mediante la expresión aumentada del gen guaBA

10 La clonación del gen guaBA (Tiedeman, A. A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:8676-8679, 1985 y *Nucleic Acids Res.* 13:1303-1316, 1985 [GenBank M10101]) se llevó a cabo a partir de ADN genómico de *Escherichia coli* (cepa W 3110) mediante PCR. El ADN genómico de *Escherichia coli* (cepa W 3110) se preparó mediante un método conocido (Seibutsu Kogaku Jikkensho [publicado por Baifukan, p. 97-98]). Se llevó a cabo una PCR de forma convencional mediante la utilización del cebador sentido P 33 (SEQ ID NO: 33) y el cebador antisentido P 34 (SEQ ID NO: 34) para
15 preparar ADN que contenía gen guaBA de *Escherichia coli*. Luego, el gen guaBA resultante se subclonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen) para preparar pCR2.1-guaBA. Posteriormente, el pCR2.1-guaBA fue escindido por *Bam*HI y *Xho*I y se insertó un fragmento de 3 kb que contenía el gen guaBA en fragmentos *Bam*HI y *Xho*I (3,9 kb) de pMW218 (Nippon Gene) para preparar pMW218-guaBA (Fig. 19). Este plásmido se introdujo en la cepa AG14/pSTV28-GPS mediante un método de cloruro de calcio para preparar AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA). La selección y el
20 cultivo de la cepa transformada se llevaron a cabo en un medio que contenía kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (25 µl/ml). La cepa preparada se cultivó mediante un método mencionado en el Ejemplo 4 y la cantidad producida se midió a partir del área de pico mediante análisis por HPLC, con lo cual se encontró que se habían producido 580 mg/L de BP (Tabla 1).

25 Ejemplo 10

Aumento de la cantidad producida del compuesto de biopterina debido a un aumento de la cantidad expresada de GCH

30 Se trataron pSTV28-GCH y pUC18-PTPS con *Eco*RI y *Sal*I para aislar el gen folE y el gen de PTPS de rata y cada uno se insertó en sitios de *Eco*RI y *Sal*I existentes en un sitio de clonación múltiple de pTWV228 (Takara Shuzo) para preparar pTWV228-GCH y pTWV228-PTPS. De forma similar, se trató PUC19-SPR con *Hind*III para aislar gen de SPR de rata y se insertó en *Hind*III existente en un sitio de clonación múltiple de pTWV229 (Takara
35 Shuzo) para preparar pTWV229-SPR. Cada uno de los tres plásmidos preparados de esta forma se introdujo en la cepa AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA) y se midió la cantidad producida del compuesto de biopterina mediante el método mencionado en el Ejemplo 4. La selección y el cultivo de la cepa transformada se llevaron a cabo en un medio que contenía ampicilina (25 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml).

40 Las cantidades producidas de la bacteria preparada fueron 524 mg/L para AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA, pTWV228-GCH), 337 mg/L para AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA, pTWV228-PTPS) y 465 mg/L para AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA, pTWV229-SPR). Como resultado de que el plásmido se había introducido recientemente, se confirmó un aumento en la cantidad expresada de cada enzima mediante análisis por SDS-PAGE.

45 A partir del resultado precedente se encontró que, con respecto a los tres tipos de genes enzimáticos que participan en la producción de THBP, fue posible mejorar la cantidad producida del compuesto de biopterina cuando aumentó su cantidad expresada y que, en particular, cuando aumentó la cantidad expresada del gen de GCH, fue posible mejorar aun más la cantidad producida del compuesto de biopterina.

50 Ejemplo 11

Aumento de la producción del compuesto de biopterina mediante la utilización del gen de GCH de Bacillus subtilis (mtrA)

55 La clonación de mtrA (Gollnick, P., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:8726-8730, 1990, [GenBank M37320]), que era un gen de GCH de *Bacillus subtilis*, se llevó a cabo a partir de la cepa 1A1 de *Bacillus subtilis* mediante una PCR. El ADN genómico de *Bacillus subtilis* se preparó mediante un método conocido (*Idenshi Hatsugen Jikken Manual* [Kodansha Scientific, p. 31-33]). Se llevó a cabo una PCR mediante un método convencional utilizando el
60 cebador sentido P35 (SEQ ID NO: 35) y el cebador antisentido P36 (SEQ ID NO: 36) para preparar el ADN que contenía el gen mtrA de *Bacillus subtilis*. Posteriormente, el producto de la PCR resultante se utilizó como molde y se llevó a cabo una PCR nuevamente utilizando el cebador sentido P37 (SEQ ID NO: 37) y el cebador antisentido P 38 (SEQ ID NO: 38) y el producto fue escindido por *Eco*RI y *Xba*I y se conectó a un producto digerido de pUC18 mediante *Eco*RI-*Xba*I para preparar pUC18-mtrA.

65 Posteriormente, el gen mtrA se extirpó de pUC18-mtrA con *Eco*RI y *Xba*I y éstos se conectaron a un fragmento obtenido por la digestión de pSTV28-GPS con *Eco*RI y *Sph*I (3,0 kb) y un fragmento obtenido por la digestión de pSTV28-GPS con *Xba*I y *Sph*I (1,4 kb) para preparar pSTV28-MPS (Fig. 20). Luego, la cepa AG14/pMW218-guaBA

fue transformada por el pSTV28-MPS resultante para preparar AG14/(pSTV28-MPS, pMW218-guaBA) y la cantidad de THBP producida se midió mediante el método mencionado en el Ejemplo 4. El cultivo se llevó a cabo en un medio que contenía kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml). Como resultado, la cepa [AG14/(pSTV28-MPS, pMW218-guaBA)] que tenía el gen de GCH de *Bacillus subtilis* mostró una gran cantidad producida de THBP (770 mg/L) y se encontró que, cuando se utilizó el gen de GCH (mtrA) de *Bacillus subtilis*, la cantidad producida del compuesto de biopterina aumentó aun más (Tabla 1).

TABLA 1

Cepa	Producción de THBP [detectada como BP]
JM101/pSTV28-GPS	23 mg/L
AG14/pSTV28-GPS	250 mg/L
AG14/(pSTV28-GPS, pMW218-guaBA)	580 mg/L
AG14/(pSTV28-MPS, pMW218-guaBA)	770 mg/L

Ejemplo 12

*Cultivo de cepa con expresión aumentada de guaBA y cepa que lleva gen homólogo de GCH derivado de *Bacillus subtilis* mediante fermentador de tanque*

Se sometieron AG14/(pSTV28-GPS,pMW218-guaBA), que era una cepa con una expresión aumentada de guaBA, y AG14/(pSTV28-MPS,pMW218-guaBA), en la que se había introducido el gen de GCH de *Bacillus subtilis*, a un cultivo a escala de dos litros de acuerdo con un método mencionado en los Ejemplos 7 y 8. Como resultado, se produjo la BP calculada a partir del área de pico en el análisis por HPLC en una cantidad de 2,4 g/L en el caso de AG14/(pSTV28-GPS,pMW218-guaBA) y en una cantidad de 4 g/L en el caso de AG14/(pSTV28-MPS,pMW218-guaBA) mediante un cultivo durante 42 horas (Fig. 21).

Ejemplo 13

*Preparación de los vectores de expresión pDG148MPS y pDG148MPSΔI para *Bacillus subtilis**

Los vectores de expresión pDG148MPS y pDG148MPSΔI para *Bacillus subtilis* se prepararon de la siguiente manera.

(1) Preparación de pUC18SD (remitirse a la Fig. 22)

Se mezclaron los oligonucleótidos P39 (SEQ ID NO: 39) y P40 (SEQ ID NO: 40) que tenían secuencias complementarias y, por otro lado, se mezclaron P41 (SEQ ID NO: 41) y P42 (SEQ ID NO: 42) que tenían las secuencias complementarias para preparar dos fragmentos de ADN de doble cadena. Cada fragmento se sometió a una reacción de adición de un grupo fosfato a cada extremo 5' por la polinucleótido quinasa T4 y se clonó en el sitio *HindIII-EcoRI* de pUC18.

La secuencia de aproximadamente 45 bp entre *HindIII* y *EcoRI* del plásmido pUC18SD resultante contenía una secuencia de ADN que codificaba la región de inicio de la traducción que comenzaba en la secuencia SD (secuencia Shine-Dalgarno) adecuada para la expresión génica de *Bacillus subtilis* y una secuencia de aminoácidos de MS-NITNS (metionina-serina-asparagina-isoleucina-treonina-asparagina-serina) (Fujita, *et al. Microbiology*, 140:6571-6580, 1998).

(2) Preparación de pVC18ΔE (remitirse a la Fig. 23)

El pUC18 fue completamente digerido por *EcoRI*, se le agregó adicionalmente nucleasa de judía Mung, la mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, se realizó la purificación con etanol y se llevó a cabo una reacción de ligación para preparar pUC18ΔE. Se confirmó que el plásmido resultante no había de escindir por *EcoRI*. Mediante secuenciación de ADN se confirmó que la secuencia de reconocimiento 5'-GAATTC-3' de *EcoRI* cambió a 5'-GATT-3'.

(3) Preparación de pUC18ΔESDmtrA (remitirse a la Fig. 24)

Para la clonación del gen mtrA se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de ADN genómico de *Bacillus subtilis* como molde y de P43 (SEQ ID NO: 43) y P44 (SEQ ID NO: 44), luego se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de ADN amplificado como molde y de P45 (SEQ ID NO: 45) y P46 (SEQ ID NO: 46), P45 (SEQ ID NO: 45) y P47 (SEQ ID NO: 47) para introducir sitios de escisión para enzimas de restricción. Los extremos de los fragmentos de ADN resultantes fueron digeridos por *EcoRI* y *PstI* y se conectaron al fragmento de ADN *HindIII-EcoRI* (secuencia SD) preparado a partir de pUC18SD y al fragmento de ADN *HindIII-PstI* de 2,6 kb derivado de pUC16ΔE para preparar pUC18ΔESDmtrA. La Fig. 31 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de mtrA clonada en pUC18ΔESDmtrA. A propósito, la parte subrayada muestra una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína CcpA que ha de agregarse al extremo amino de mtrA (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998).

(4) Preparación de pUC18SDPTPS (remitirse a la Fig. 25)

Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de pUC18SD como molde y de los cebadores P50 (SEQ ID NO: 50) y P48 (SEQ ID NO: 48) y los extremos del fragmento de ADN resultante fueron digeridos por *XbaI* y *EcoRI* para preparar un fragmento de ADN que contenía la secuencia SD. Asimismo, se utilizó el pUC18-PTPS preparado en la etapa del Ejemplo 1 como se muestra en la Fig. 4 como molde y se utilizaron los cebadores P50 (SEQ ID NO: 50) y P49 (SEQ ID NO: 49) para preparar un fragmento *EcoRI-SalI* de 0,45 kb que contenía el gen de PTPS. Los mismos se conectaron a un fragmento de ADN de *XbaI-SalI* de 2,6 kb derivado de pUC18 para preparar pUC18SDPTPS. La Fig. 32 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de PTPS clonada en pUC18SDPTPS. A propósito, la parte subrayada muestra una secuencia de aminoácidos de la proteína CcpA que ha de agregarse al extremo amino de PTPS (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998).

(5) Preparación de pUC18ΔESDSPR (remitirse a la Fig. 26)

Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de pUC18SD como molde y de los cebadores P51 (SEQ ID NO: 51) y P53 (SEQ ID NO: 53) y los extremos del fragmento de ADN resultante fueron digeridos por *SalI* y *EcoRI* para preparar un fragmento de ADN que contenía la secuencia SD. Asimismo, se utilizó el pUC19-SPR preparado en la etapa del Ejemplo 1 como se muestra en la Fig. 5 como molde y se utilizaron los cebadores P52 (SEQ ID NO: 52) y P53 (SEQ ID NO: 53) para preparar un fragmento *EcoRI-SphI* de 0,8 kb que contenía el gen de SPR. Los mismos se conectaron a un fragmento de ADN de *SalI-SphI* de 2,6 kb derivado de pUC18ΔE para preparar pUC18ΔESDSPR. La Fig. 33 muestra una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia base de ADN de SPR clonada en pUC18ΔESDSPR. A propósito, la parte subrayada muestra una secuencia de aminoácidos de la proteína CcpA que ha de agregarse al extremo amino de SPR (Fujita, *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998).

(6) Preparación de pSL1180PS (remitirse a la Fig. 27)

El pUC18SDPTPS preparado según la etapa que se muestra en la Fig. 25 precedente fue digerido por *XbaI* y *SalI* para preparar un fragmento (secuencia SD + PTPS) de 0,5 kb. Posteriormente, el pUC18ΔESDSPR preparado según la etapa que se muestra en la Fig. 6 precedente fue digerido por *SalI* y *SphI* para purificar un fragmento (secuencia SD + SPR) de 0,85 kb. Estos fragmentos se conectaron al producto digerido por *XbaI* y *SphI* (3,4 kb) de pSL1180 para preparar pSL1180PS.

(7) Preparación de pSL1180MPS (remitirse a la Fig. 28)

El pUC18ΔESDmtrA preparado según la etapa que se muestra en la Fig. 24 precedente fue digerido por *HindIII* y *XbaI* para preparar un fragmento de 0,63 kb, el cual se conectó a un fragmento de 4,7 kb obtenido mediante la digestión de pSL1180PS por parte de *HindIII* y *XbaI* para preparar pSL1180MPS.

(8) Preparación de pDG148MPS, vector de expresión para *Bacillus subtilis* (remitirse a la Fig. 29)

El pSL1180MPS preparado según la etapa que se muestra en la Fig. 28 precedente fue digerido por *HindIII* y *SphI* para preparar un fragmento de ADN de 2,0 kb en el que los genes mtrA, de PTPS y SPR se alinearon sucesivamente. Por otro lado, un vector lanzadera pDG148, que pudo utilizarse para *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Karmazyn-Campelli, *et al.*, *Cell*, 52, 697-704, 1988) fue digerido por *HindIII* y *SphI* para preparar un fragmento de ADN de 8,2 kb, el cual se conectó al fragmento de ADN de 2,0 kb previamente preparado para preparar pDG148MPS, un vector de expresión para *Bacillus subtilis*. A propósito, en la Fig. 29, Pspac es promotor *spac*, lacI es gen *lacI*, lacO es región reguladora de la expresión por parte de la proteína *lacI*, Km es gen resistente a la kanamicina, Ap es gen resistente a la ampicilina y ori es origen de la replicación de plásmido.

En este vector de expresión pDG148MPS se codifica una secuencia *lacO* corriente abajo del promotor *spac* (*Pspac*) y se codifica el gen *lacI* que induce la expresión en *Bacillus subtilis* corriente abajo del sitio de clonación múltiple. Por lo tanto, en *Bacillus subtilis*, la transcripción por parte del promotor *spac* es suprimida por la proteína *lacI*. Sin embargo, cuando se agrega al medio IPTG, que es una sustancia inductora, se activa la transcripción por parte del promotor *spac* y se induce la expresión del gen corriente abajo. Corriente arriba de los genes *mtrA*, de PTPS y de SPR se encuentran alineadas una secuencia SD, cada una adecuada para la expresión génica de *Bacillus subtilis*, y una secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción que comienza en una secuencia de aminoácidos de MSNITNS (metionina-serina-asparagina-isoleucina-treonina-asparagina-serina). La transcripción de estos tres genes alineados en forma de operón es inducida por el promotor *spac*.

(9) Preparación de pDG148MPSΔI, vector de expresión para *Bacillus subtilis* (remitirse a la Fig. 30)

El pSL1180MPS preparado según la etapa que se muestra en la Fig. 28 precedente fue digerido por *HindIII* y *BamHI*, que eran enzimas de restricción, para preparar un fragmento de ADN de 2,0 kb en donde los genes *mtrA*, de PTPS y de SPR se alinearon sucesivamente. Esto se conectó al producto digerido precedente (6,9 kb) de pDG148 por *HindIII* y *BamHI* para preparar pDG148MPSΔI, un vector de expresión para *Bacillus subtilis*. A propósito, en la Fig. 30, *Pspac* es promotor *spac*, *lacO* es región reguladora de la expresión por parte de la proteína *lacI*, Km es gen resistente a la kanamicina, Ap es gen resistente a la ampicilina y ori es origen de la replicación del plásmido.

En este vector de expresión pDG148MPSΔI se encuentra disponible una secuencia de *lacO* corriente abajo del promotor *spac* (*Pspac*) pero, dado que la parte del gen *lacI* carece de pDG148, no se produce una supresión del promotor *spac* en *Bacillus subtilis*. Por lo tanto, la expresión del gen corriente abajo se induce constantemente. Corriente arriba de los genes *mtrA*, de PTPS y de SPR se encuentran alineadas una secuencia SD, cada una adecuada para la expresión génica de *Bacillus subtilis*, y una secuencia de ADN que codifica la región de inicio de la traducción que comienza en una secuencia de aminoácidos de MSNITNS. La transcripción de estos tres genes alineados en forma de operón es inducida por el promotor *spac*.

Ejemplo 14

Producción del compuesto de biopterina por parte de *Bacillus subtilis*

La cepa 1A1 de *Bacillus subtilis* (*trPC2*) (Fujita. *et al.*, *Microbiology*, 140:6571-6580, 1998) se transformó con pDG148MPS o pDG148MPSΔI de acuerdo con el siguiente método. De esta manera, cada uno de los plásmidos de pDG148MPS y pDG148MPSΔI utilizados para la transformación fue un vector derivado de un vector lanzadera pDG148 (Karmazyn-Campelli, *et al.*, *Cell*, 52, 697-704, 1988) que era transformable tanto para *Escherichia coli* como para *Bacillus subtilis* y, en el caso de *Escherichia coli*, pudo utilizarse la resistencia a la ampicilina como un marcador selectivo mientras que, en el caso de *Bacillus subtilis*, pudo utilizarse la resistencia a la kanamicina como marcador selectivo.

Se sembró la cepa 1A1 de *Bacillus subtilis* en una placa TBABG y se llevó a cabo una incubación previa durante 12 horas. [Composición en 1L de la placa TBABG: 10 g de triptona, 3 g de extracto de carne, 5 g de NaCl, 15 g de agar-agar en polvo y 1,8 g de glucosa].

Las células se rasparon de la placa y se suspendieron en 2 ml de un medio CI. [Composición del medio CI: 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4% de K_2HPO_4 , 0,6% de KH_2PO_4 , 0,1% de citrato de $\text{Na}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM de MgSO_4 , 0,5% de glucosa, 0,02% de ácido casamino y 50 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano (*trp*)].

La suspensión resultante se diluyó con el medio CI para obtener $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,08$ y se sometió a un cultivo en agitación a 37°C. Durante el cultivo se midieron adecuadamente los valores de $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ para confirmar que el crecimiento hubiera entrado en la fase estacionaria.

El caldo de cultivo (2,5 ml) se centrifugó (a 2500 rpm y temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos) y las células recolectadas se suspendieron en 5 ml de un medio CII y se sometieron a un cultivo en agitación durante aproximadamente 30 minutos para proporcionar células competentes. [Composición del medio CII: 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4% de K_2HPO_4 , 0,6% de KH_2PO_4 , 0,1% de citrato de $\text{Na}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM de MgSO_4 , 0,5% de glucosa, 0,01% de ácido casamino y 5 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano (*trp*)].

La célula competente (1 ml) se mezcló con 1 μg de pDG148MPS o pDG148MPSΔI preparados a partir de la cepa JM101 de *Escherichia coli* que era una cepa recA^+ y se sometió a un cultivo en agitación suavemente a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, el caldo de cultivo se sembró en una placa TBABG que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y se incubó a 37°C durante aproximadamente 12 horas para proporcionar cada uno de los transformantes 1A1/pDG148MPS y 1A1/pDG148MPSΔI.

La colonia de cada uno de los transformantes resultantes se cultivó previamente en 3 ml de un medio LB que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina (Km) durante aproximadamente 3 horas. Posteriormente, se inoculó en un medio NU (3,5 ml) que contenía 2% de glucosa, 1 nM de IPTG y 5 $\mu\text{g/ml}$ de Km y se sometió a un cultivo en agitación

ES 2 320 531 T3

a 37°C durante 20 horas. También se llevó a cabo un cultivo similar en un medio que no contenía kanamicina para *Bacillus subtilis* como testigo para cada cepa. [Composición del medio NU (por 1L): 4 g de extracto de levadura, 4 g de KH_2PO_4 , 4 g de K_2HPO_4 , 2,8 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de NH_4Cl , 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g de FeSO_4 , 0,04 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,004 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,0005 g de H_3BO_3].

El resultado fue que, en todas las cepas que incluían la cepa testigo, los valores de $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ fueron de 10 a 12. El crecimiento de las células fue bueno y no se observaron cambios por transformación o expresión génica inducida por IPTG. El sobrenadante del caldo de cultivo luego de 20 horas del comienzo del cultivo se oxidó mediante un método mencionado en el Ejemplo 4 y se sometió a un análisis por HPLC.

El resultado del análisis por HPLC se muestra en la Fig. 34. En la cepa 1A1 (extremo derecho), en la que no se introdujo ningún plásmido, no se notó ningún pico en la posición eluida del espécimen de BP estándar mientras que, en las otras dos cepas (1A1/pDG148MPS y 1A1/pDG148MPSΔI), se notaron picos en la posición de elución del espécimen de BP estándar, con lo cual fue evidente que el *Bacillus subtilis* preparado tenía capacidad de producción de BP. El cálculo en base a la relación de área de las áreas de pico arrojó que la cantidad de BP producida fue de aproximadamente 0,45 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos.

20 Aplicación industrial

La presente invención logra la ventaja de que los compuestos de biopterina que se espera tengan un efecto farmacológico pueden producirse en grandes cantidades a escala industrial a partir de materiales intermedios menos costosos. Como resultado, ahora es posible llevar a cabo fácilmente estudios para los compuestos de biopterina, en particular para la acción farmacológica de los mismos, y puede promoverse el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

La presente invención también logra la ventaja de que la producción de DHBP y BP, que son productos oxidados de THBP, se torna posible. Como resultado, ahora pueden llevarse a cabo fácilmente estudios para el metabolismo de los compuestos de biopterina.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de un compuesto de biopterina que comprende:

(a) transformar una célula huésped con genes que codifican la 6-piruviltetrahydropterina sintasa y la sepiapterina reductasa y, opcionalmente, la GTP ciclohidrolasa I, que son enzimas que participan en la biosíntesis de la tetrahydrobiopterina,

(b) cultivar la célula huésped transformada para producir tetrahydrobiopterina,

(c) opcionalmente oxidar la tetrahydrobiopterina resultante y

(d) recolectar uno o más compuestos de biopterina seleccionados de tetrahydrobiopterina, dihydrobiopterina y biopterina, en donde dicha célula huésped es *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Bacillus subtilis*.

2. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de biopterina en el caldo de cultivo o en un producto procesado del mismo se oxida y la biopterina se recolecta del mismo.

3. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la dihydrobiopterina y/o biopterina recolectadas se reducen para producir tetrahydrobiopterina.

4. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 3, en donde la transformación se lleva a cabo mediante un vector de expresión que tiene un gen de 6-piruviltetrahydropterina sintasa y un gen de sepiapterina reductasa y, opcionalmente, un gen de GTP ciclohidrolasa I.

5. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una actividad GTP ciclohidrolasa I que no es menor que la actividad GTP ciclohidrolasa I inherente a la célula de tipo salvaje.

6. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el gen de GTP ciclohidrolasa I que ha de introducirse en la célula huésped es un gen *mtrA* derivado de *Bacillus subtilis*.

7. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una capacidad de sintetizar GTP no menor que la capacidad de sintetizar GTP de la célula de tipo salvaje.

8. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una resistencia a la 8-azaguanina no menor que la resistencia a la 8-azaguanina de la célula de tipo salvaje.

9. El proceso para la producción de un compuesto de biopterina de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde la célula huésped es una célula genéticamente recombinante en la que se introduce el gen *guaBA* que codifica la IMP deshidrogenasa y la GMP sintasa.

10. Una célula transformada para la producción de un compuesto de biopterina mencionado en las reivindicaciones 1 a 9 en la que se introducen genes que codifican la 6-piruviltetrahydropterina sintasa y la sepiapterina reductasa y, opcionalmente, la GTP ciclohidrolasa I, que son enzimas que participan en la biosíntesis de tetrahydrobiopterina, en una célula huésped, en donde dicha célula huésped es *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Bacillus subtilis*.

11. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una capacidad de sintetizar GTP no menor que la capacidad de sintetizar GTP de la célula de tipo salvaje.

12. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una resistencia a la 8-azaguanina no menor que la resistencia a la 8-azaguanina de la célula de tipo salvaje.

13. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la célula huésped es una célula genéticamente recombinante en la que se introduce el gen *guaBA* que codifica la IMP deshidrogenasa y la GMP sintasa.

14. La célula transformada de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la célula huésped es una célula mutante que tiene una actividad GTP ciclohidrolasa I que no es menor que la actividad GTP ciclohidrolasa I inherente a la célula de tipo salvaje y se introducen un gen de 6-piruviltetrahydropterina sintasa y un gen de sepiapterina reductasa en dicha célula huésped.

15. La célula transformada de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 14, en donde el gen de GTP ciclohidrolasa I que ha de introducirse en la célula huésped es un gen *mtrA* derivado de *Bacillus subtilis*.

Fig. 1

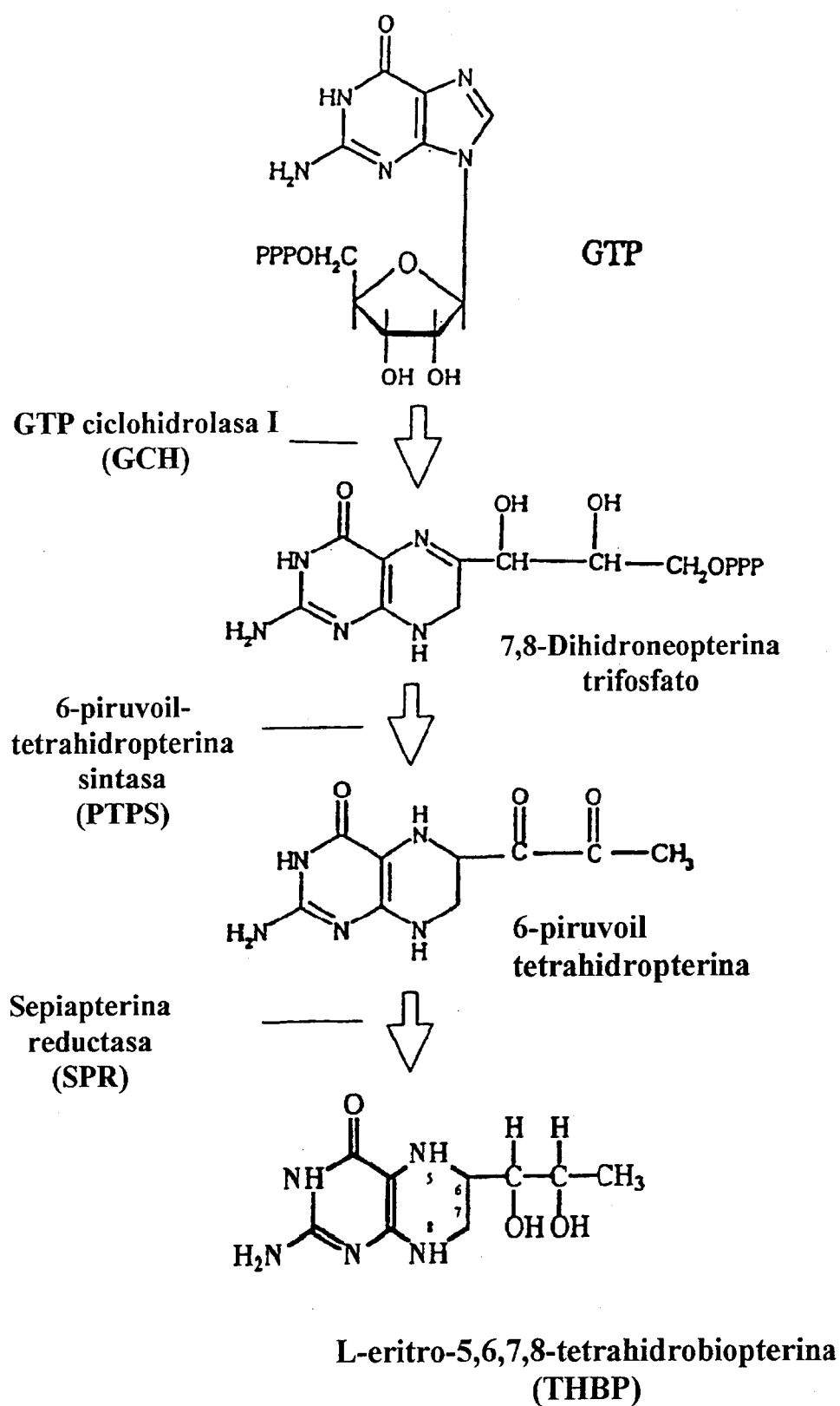


Fig. 2

Vía para la oxidación y descomposición de la tetrahidrobiopterina (THBP)

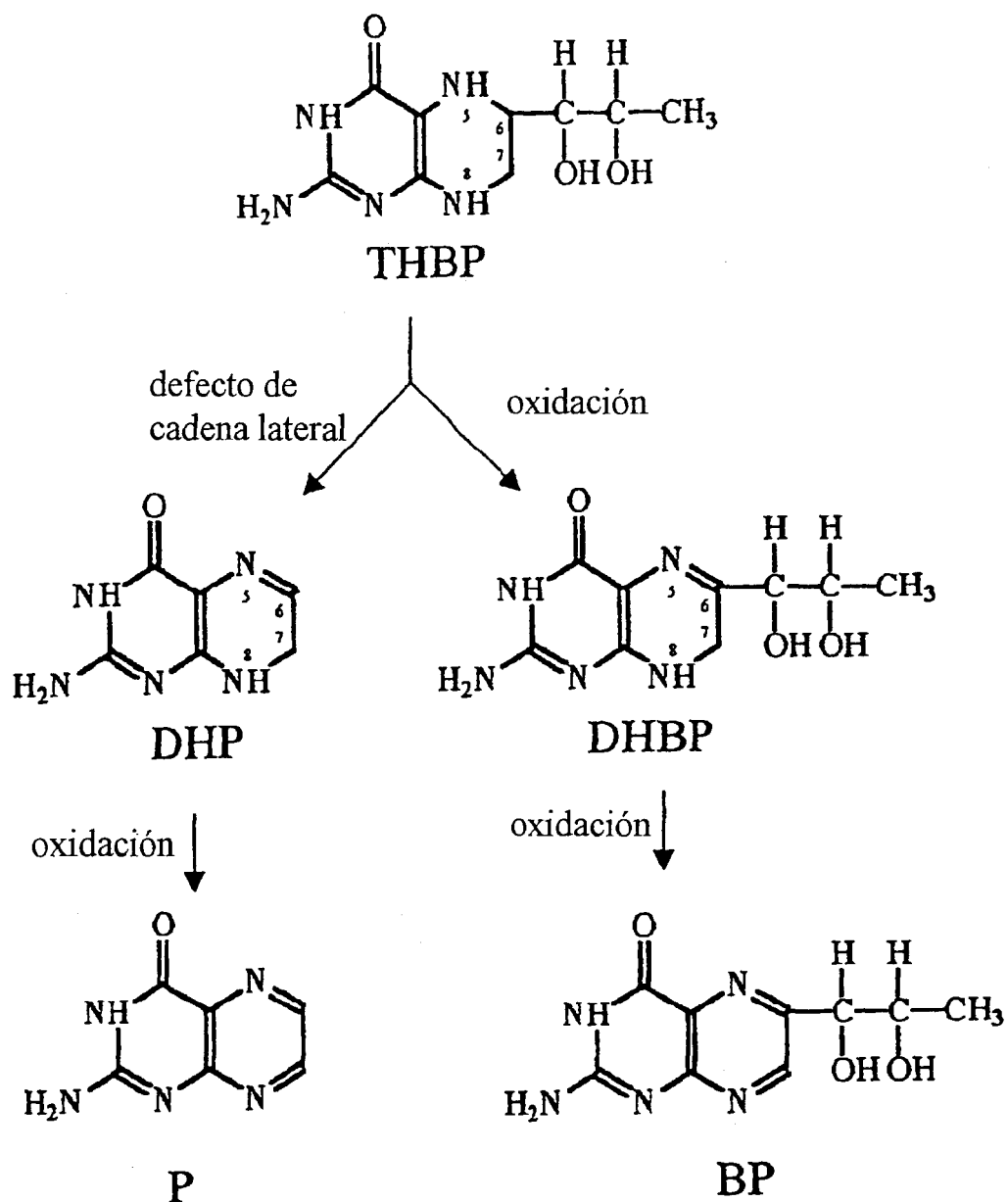


Fig. 3

Preparación de pSTV28-GCH

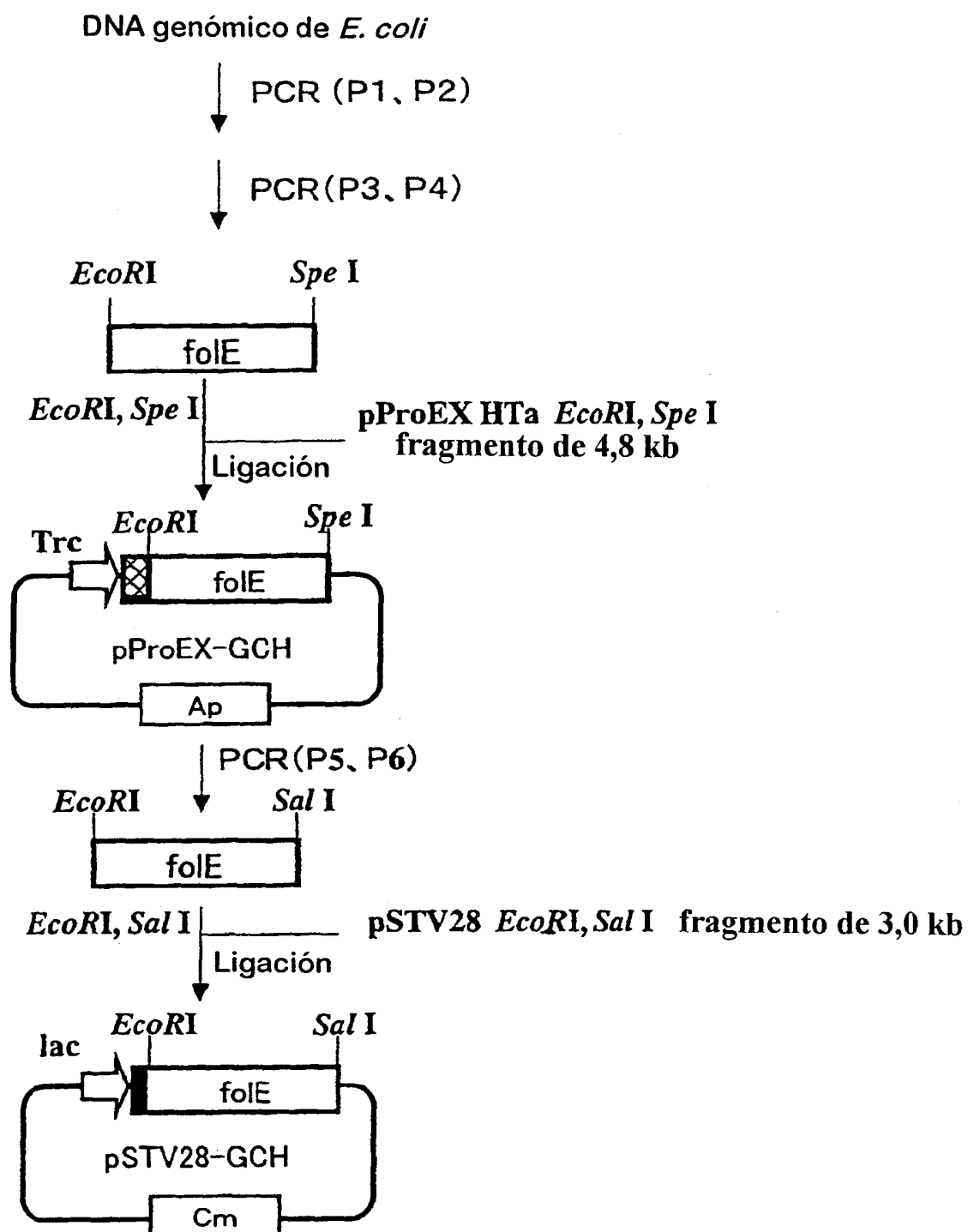


Fig.4

Preparación de pUC18-PTPS

El RNA hepático total de rata

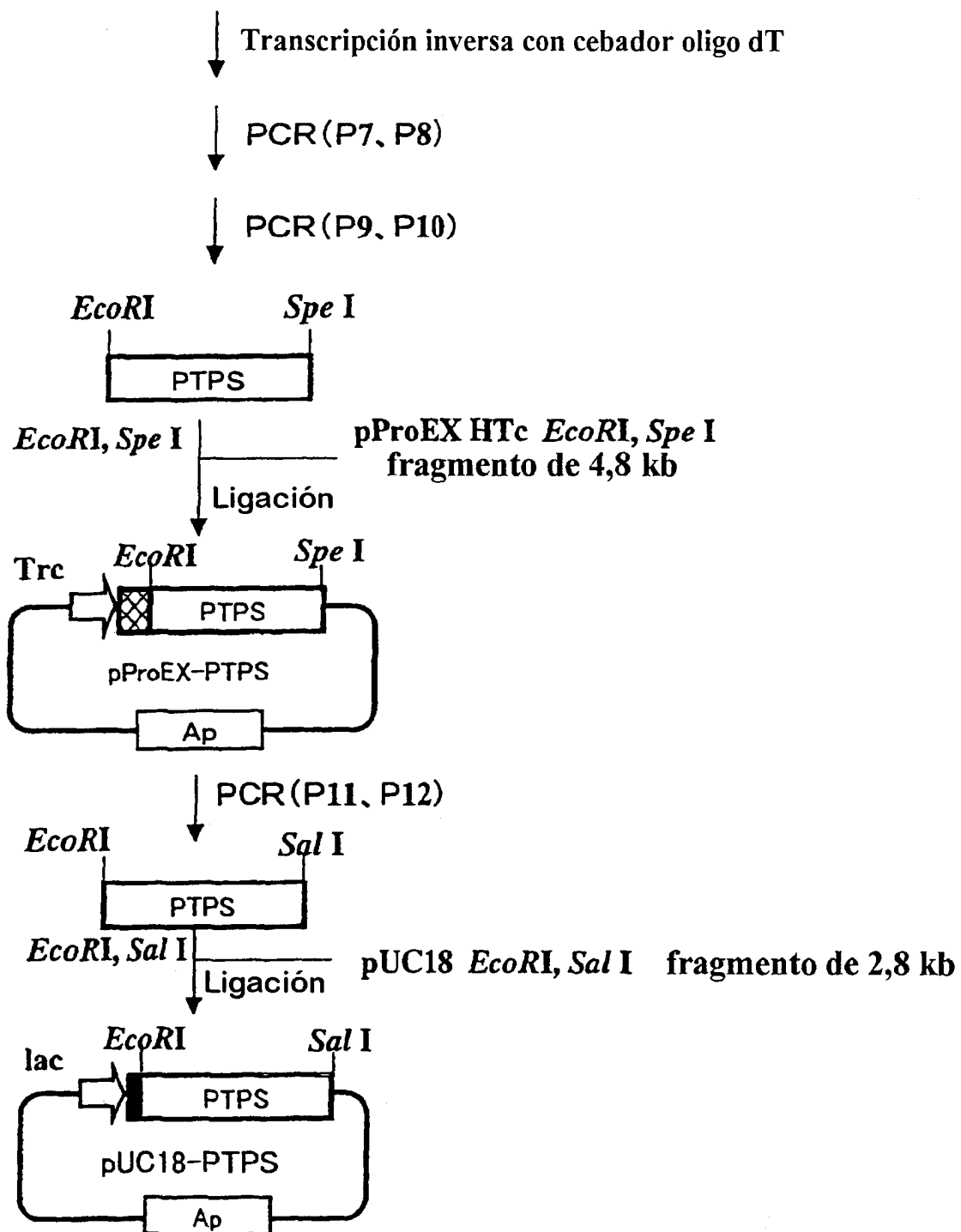


Fig. 5

Preparación de pUC19-SPR

El RNA hepático total de rata

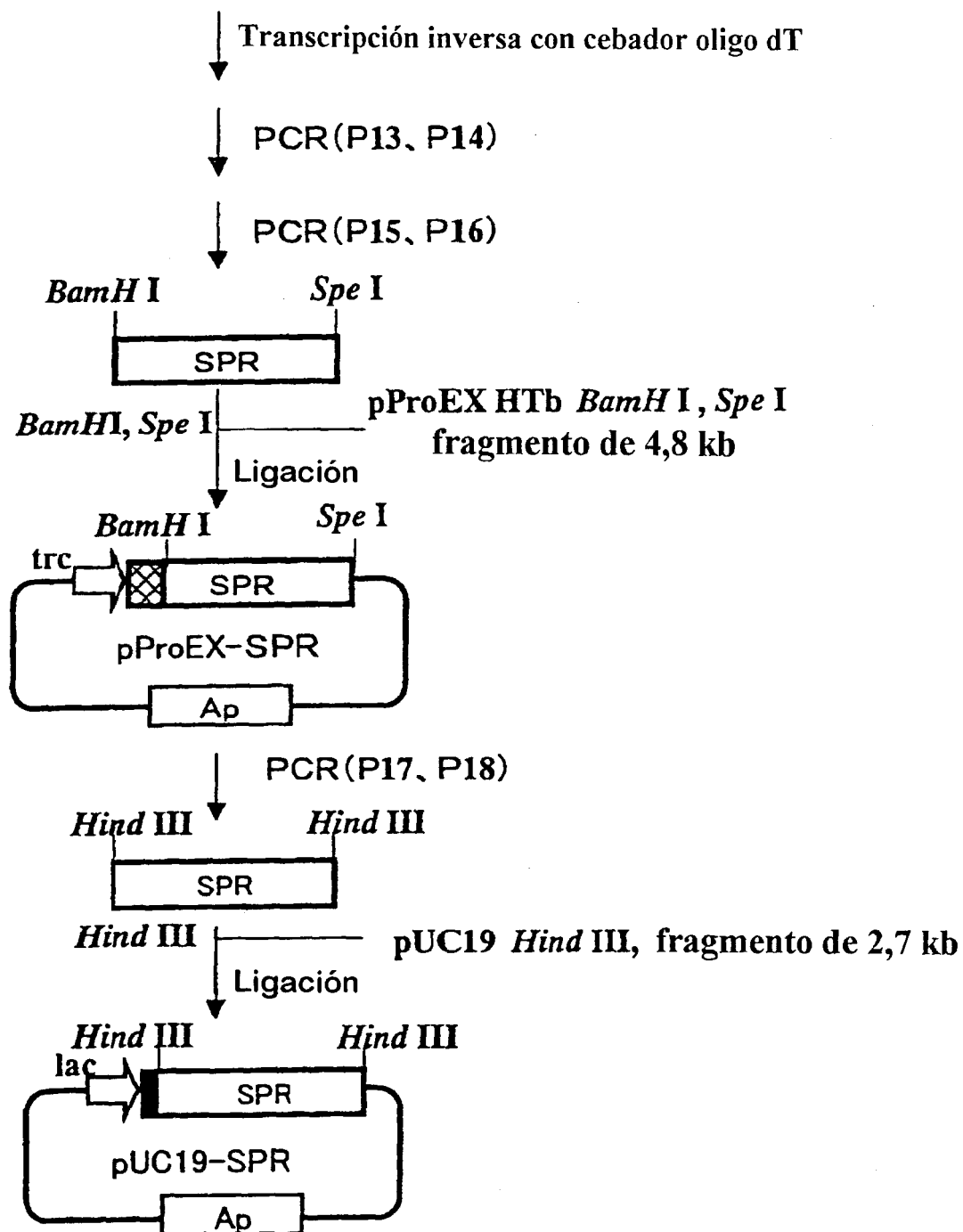


Fig. 6

Preparación de pYES2-FOL2

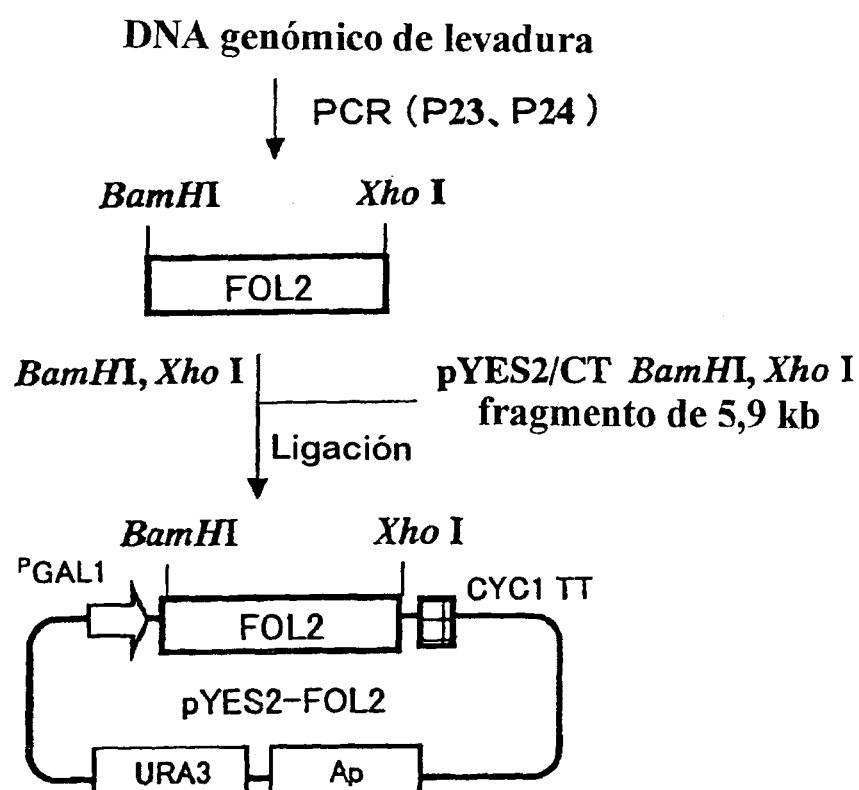


Fig.7

Preparación de pSTV28-GPS

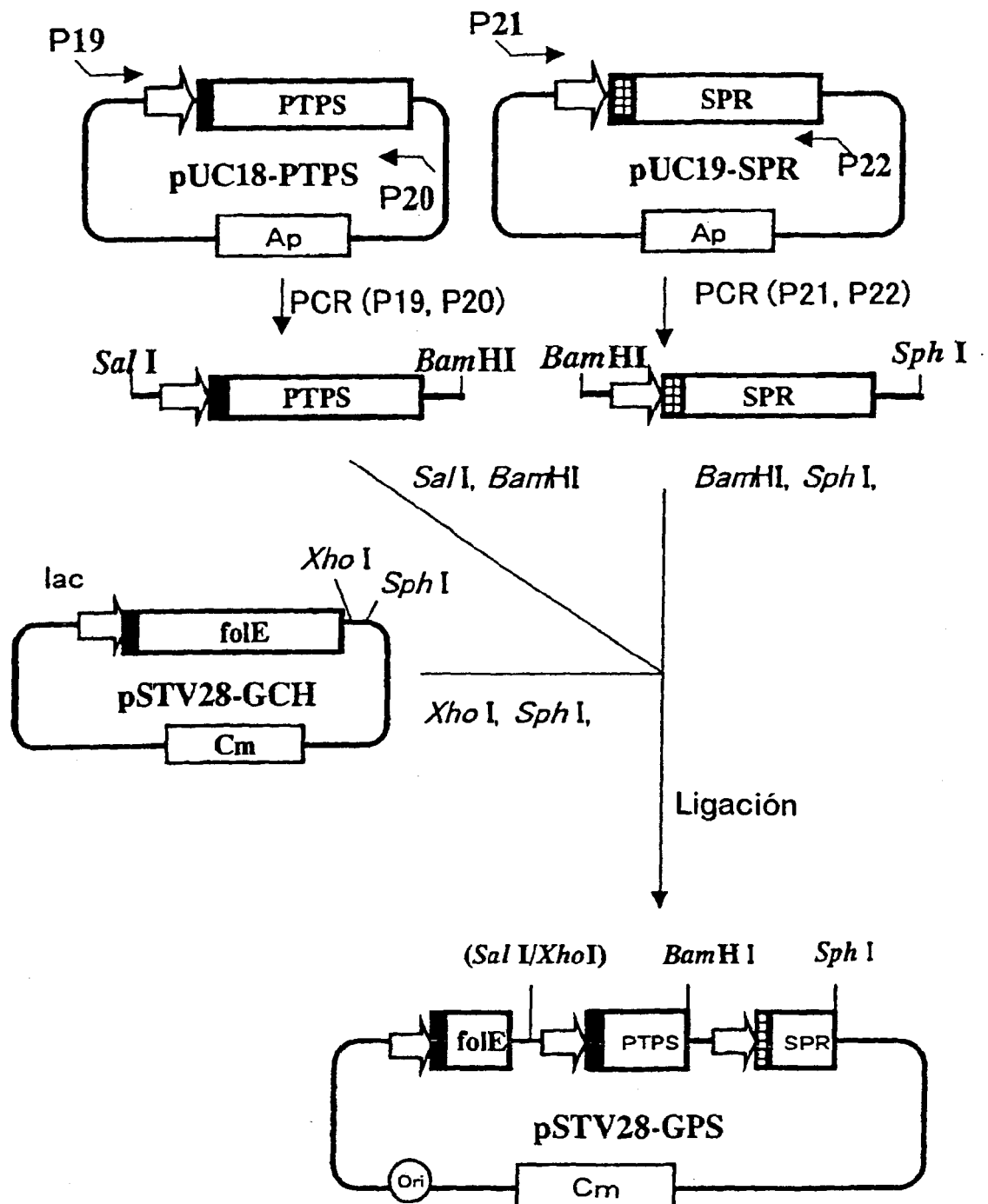


Fig.8

Preparación de pYES2-PTPS y pYES2-SPR

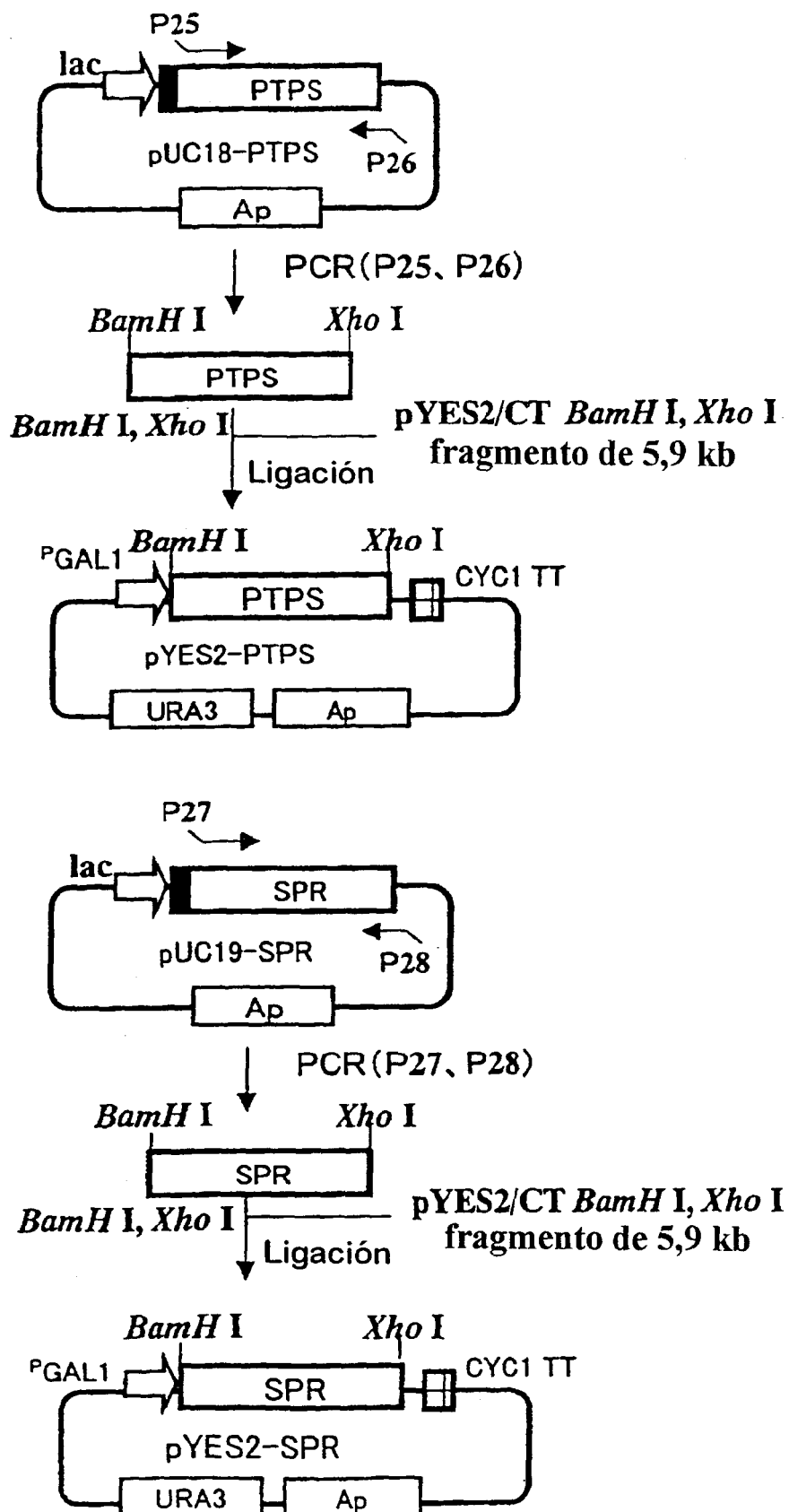


Fig. 9

Preparación de pYES2-FPS

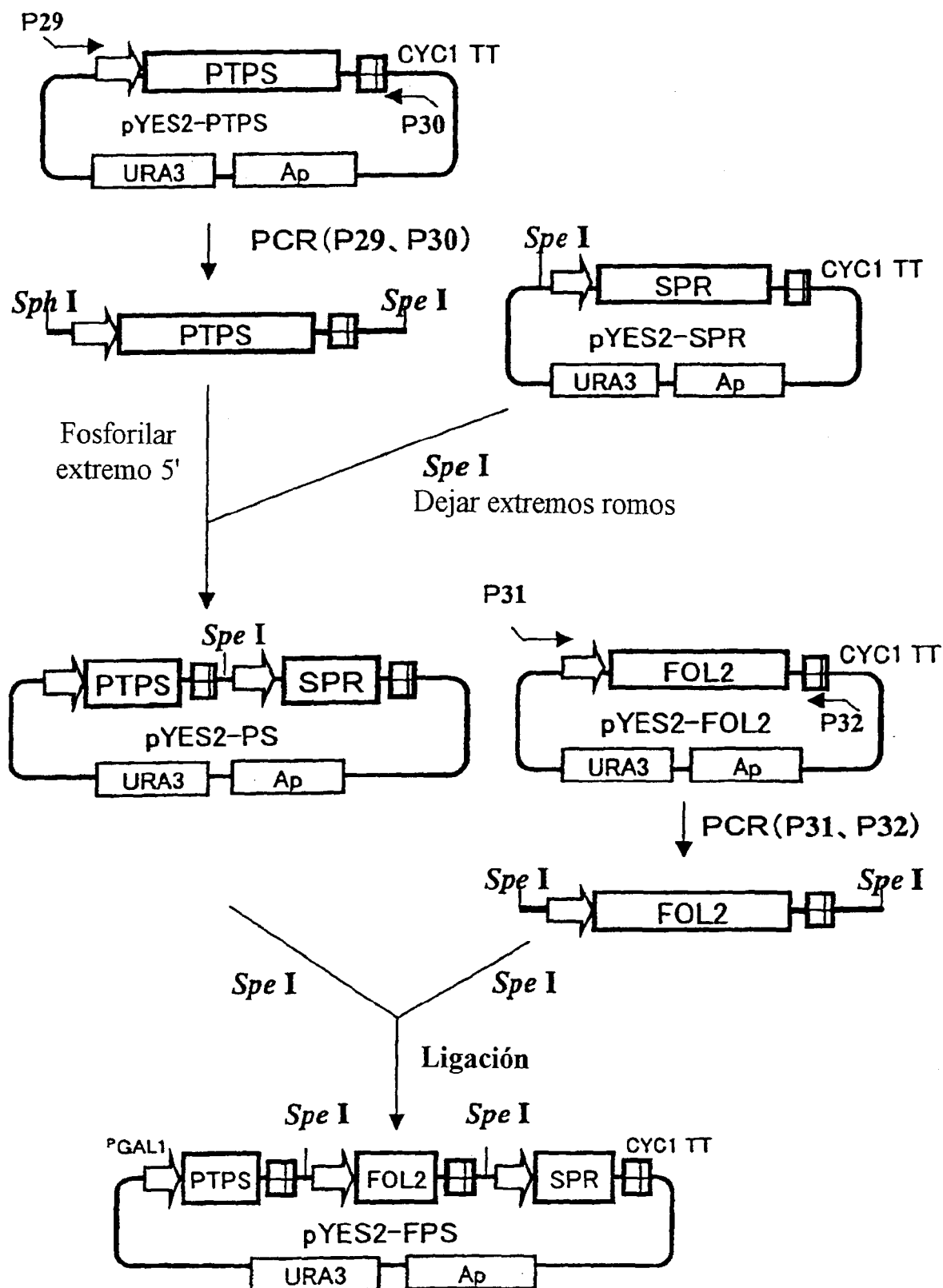


Fig. 10

atgaccatgattacgaattccatgccaatgccatcactcagtaaagaagcgccctgggtt 60
M T M I T N S M P M P S L S K E A A L V
catgaagcggttagttgcgcgaggactggaaacaccgctgcgcccggccgtgcatgaaatg 120
H E A L V A R G L E T P L R P P V H E M
gataacgaaacgcgcaaaagccttattgctgggtcatatgaccgaaatcatgcagctgctg 180
D N E T R K S L I A G H M T E I M Q L L
aatctcgacctggctgatgacagtttgatggaaacgccgcacgcacgcgctaaaatgtat 240
N L D L A D D S L M E T P H R I A K M Y
gtcgatgaaaattttctccgggtctggattacgccaatttcccgaaaatcacccctcattgaa 300
V D E I F S G L D Y A N F P K I T L I E
aacaaaatgaaggctcgatgaaatggtcaccgtgcgcgatatcactctgaccagcacctgt 360
N K M K V D E M V T V R D I T L T S T C
gaacaccattttgttaccatcgatggcaaagcgacgggtggcctatatcccgaaagattcg 420
E H H F V T I D G K A T V A Y I P K D S
gtgatcggtctgtcaaaaattaaccgcattgtgcagttctttgcccgagctccgcaggtg 480
V I G L S K I N R I V Q F F A Q R P Q V
caggaacgtctgacgcagcaaatcttattgcgctacaaacgctgctggggaccaataaac 540
Q E R L T Q Q I L I A L Q T L L G T N N
gtggctgtctcgatcgacgcgggtgcattactgcgtgaaggcgcggtggcatccgcgatgca 600
V A V S I D A V H Y C V K A R G I R D A
accagtgccacgacaacgacctctcttgggtggattgttcaaatccagtcagaatacgcgc 660
T S A T T T T S L G G L F K S S Q N T R
cacgagtttctgcgcgctgtgcgtcatcacaaactga
H E F L R A V R H H N -

Fig. 11

atgaccatgattacgaattccatgaacatgaacgcggcggttggccttcggcgccgcgcgcg 60
M T M I T N S M N M N A A V G L R R R A
cgattgtcgcgcctcgtgtccttcagcgcgagccaccggctgcacagcccattctctgagt 120
R L S R L V S F S A S H R L H S P S L S
gctgaggagaacttgaaagtgtttgggaaatgcaacaatccgaatggccatgggcacaaac 180
A E E N L K V F G K C N N P N G H G H N
tataaagttgtggtgacaattcatggagagatcgatccggttacaggaatggttatgaat 240
Y K V V V T I H G E I D P V T G M V M N
ttgactgacctcaaagaatacatggaggaggccattatgaagcccttgatcacagaac 300
L T D L K E Y M E E A I M K P L D H K N
ctggatctggatgtgccatactttgcagatgtttgtaagcacgacagaaaaatgtagctgtc 360
L D L D V P Y F A D V V S T T E N V A V
tatatctgggagaaacctgcagagacttcttcagtgaggagctctctataaagtaaaagt 420
Y I W E N L Q R L L P V G A L Y K V K V
tatgaaactgacaacaacattgtggtctacaaaggagaatag
Y E T D N N I V V Y K G E -

Fig. 12

```

atgaccatgattacqccaagcttgggcaggggcaggctagggttgcgctgtctgcgtgctg 60
M T M I T P S L G R G R L G C A V C V L
accggggcttcccggggcttcggccgcgccctggccccgcagctggccgggttgctgtcg 120
T G A S R G F G R A L A P Q L A G L L S
cccgggttcggtgttgcttctaagcgacgcagtgactcgatgctgcggcaactgaaggag 180
P G S V L L L S A R S D S M L R Q L K E
gagctctgtacgcagcagccggggcctgcaagtgggtgctggcagccgcccgatttgggcacc 240
E L C T Q Q P G L Q V V L A A A D L G T
gagtccggcgtgcaacagttgctgagcgcgggtgcgcgagctccctaggccccgagaggctg 300
E S G V Q Q L L S A V R E L P R P E R L
cagcgcctcctgctcatcaacaatgcaggcactcttggggatgtttccaaaggcttcctg 360
Q R L L L I N N A G T L G D V S K G F L
aacatcaatgacctagctgaggtgaacaactactgggccctgaacctaacctccatgctc 420
N I N D L A E V N N Y W A L N L T S M L
tgcttgaccaccggcaccttgaatgccttctccaatagccctggcctgagcaagactgta 480
C L T T G T L N A F S N S P G L S K T V
gttaacatctcatctctgtgtgccctgcagcctttcaagggtggggactctactgtgca 540
V N I S S L C A L Q P F K G W G L Y C A
gggaaggctgcccagacatgttataccaggtcctggctgttgaggaacccagtgagg 600
G K A A R D M L Y Q V L A V E E P S V R
gtgctgagctatgccccaggtcccctggacaccaacatgcagcagttggccccgggaaacc 660
V L S Y A P G P L D T N M Q Q L A R E T
tccatggacccagagttgaggagcagactgcagaagttgaattctgagggggagctggtg 720
S M D P E L R S R L Q K L N S E G E L V
gactgtgggacttcagcccagaaactgctgagcttgctgcaaagggacaccttccaatct 780
D C G T S A Q K L L S L L Q R D T F Q S
ggagcccacgtggacttctatgacatttaa
G A H V D F Y D I -

```

Fig. 13

Análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo del compuesto de biopterina que produce JM101/pSTV28-GPS de *Escherichia coli* mediante una columna C18 de fase inversa

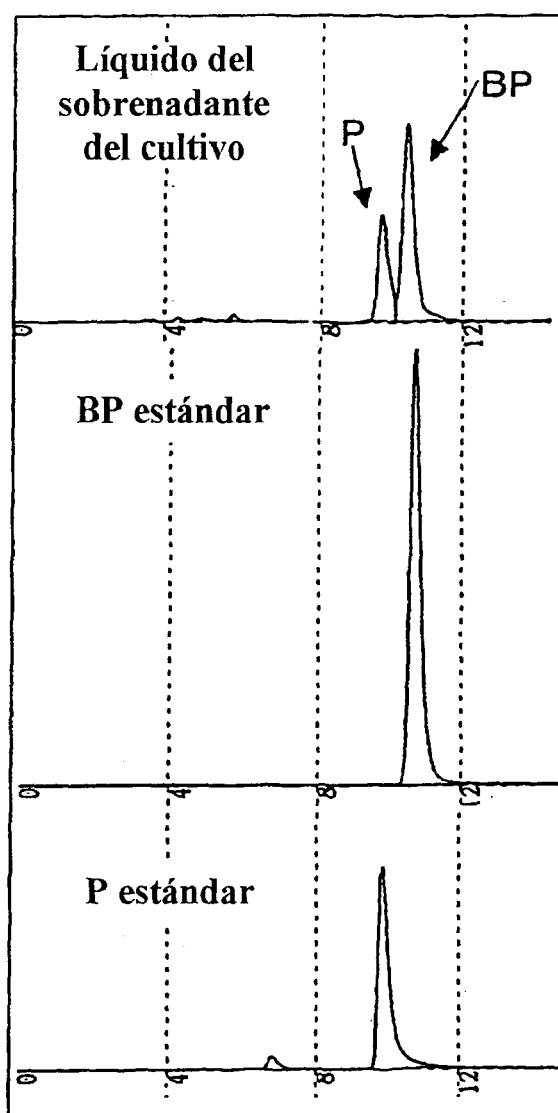


Fig. 14

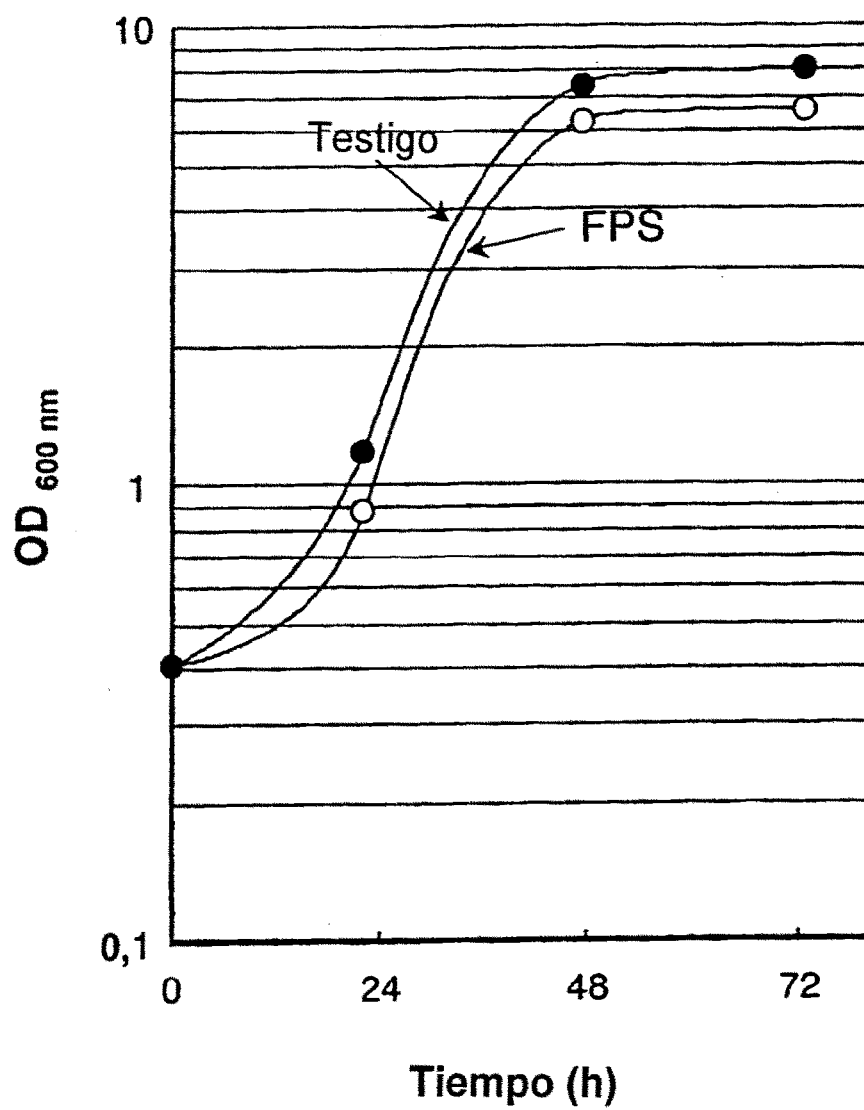


Fig. 15

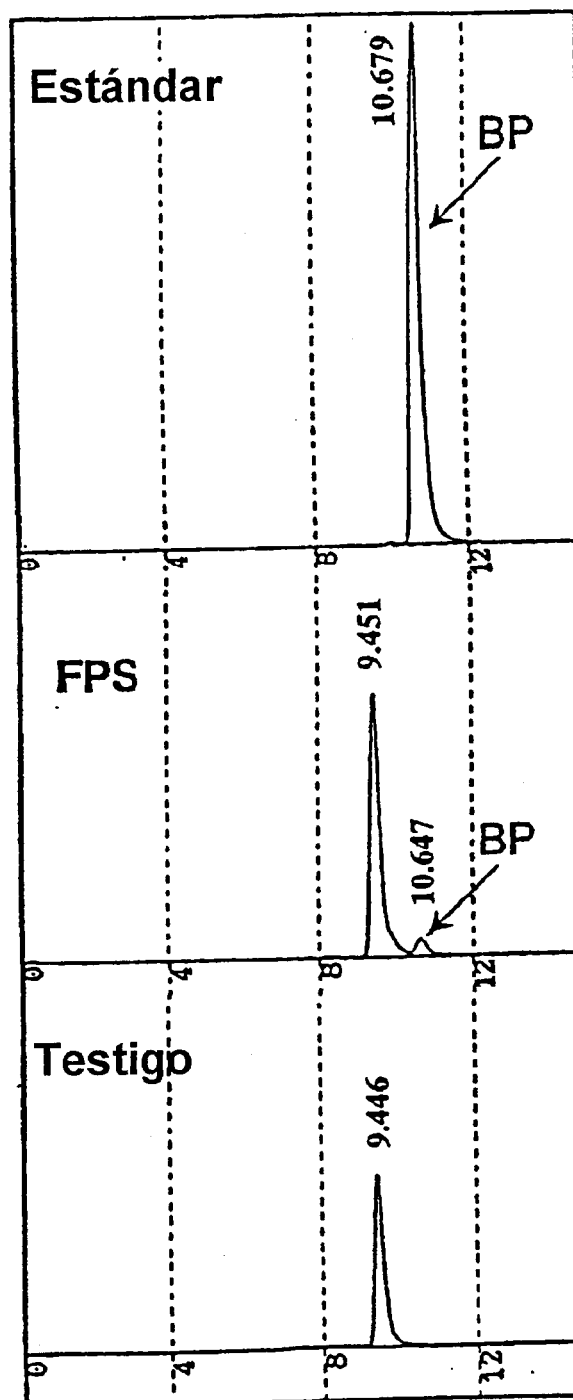


Fig. 16

Análisis por TLC del sobrenadante de cultivo del
compuesto de biopterina que produce levadura
(cepa FPS)

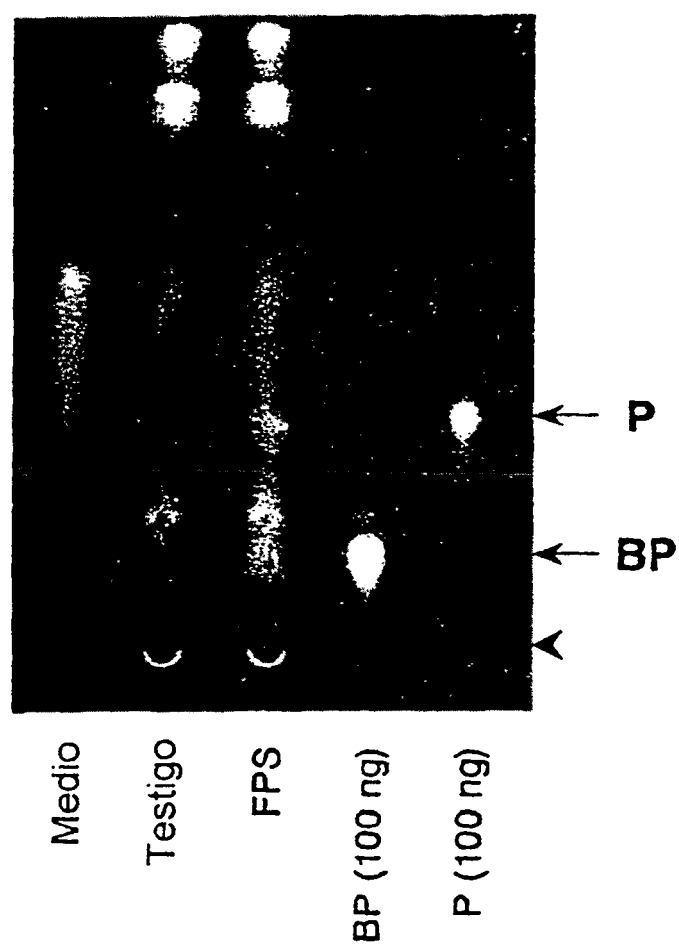


Fig.17

Análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo
del compuesto de biopterina que produce
AG14/pSTV28-GPS de *Escherichia coli* mediante
una columna C18 de fase inversa

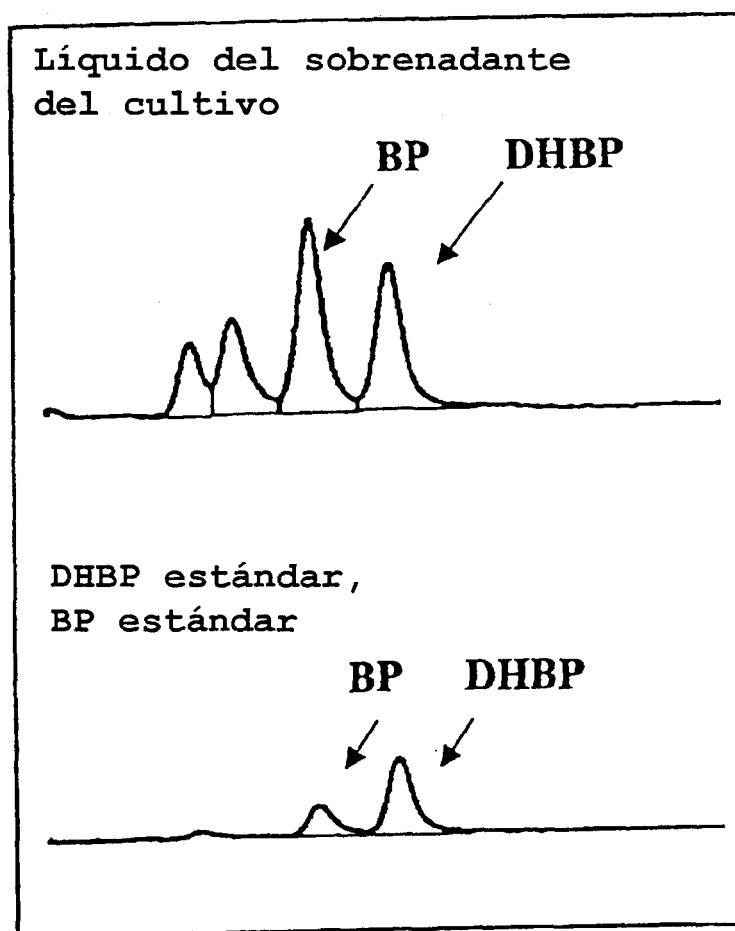


Fig. 18

Transcurso del tiempo de la producción de BP y P por parte de AG14/pSTV28-GPS de *Escherichia coli*

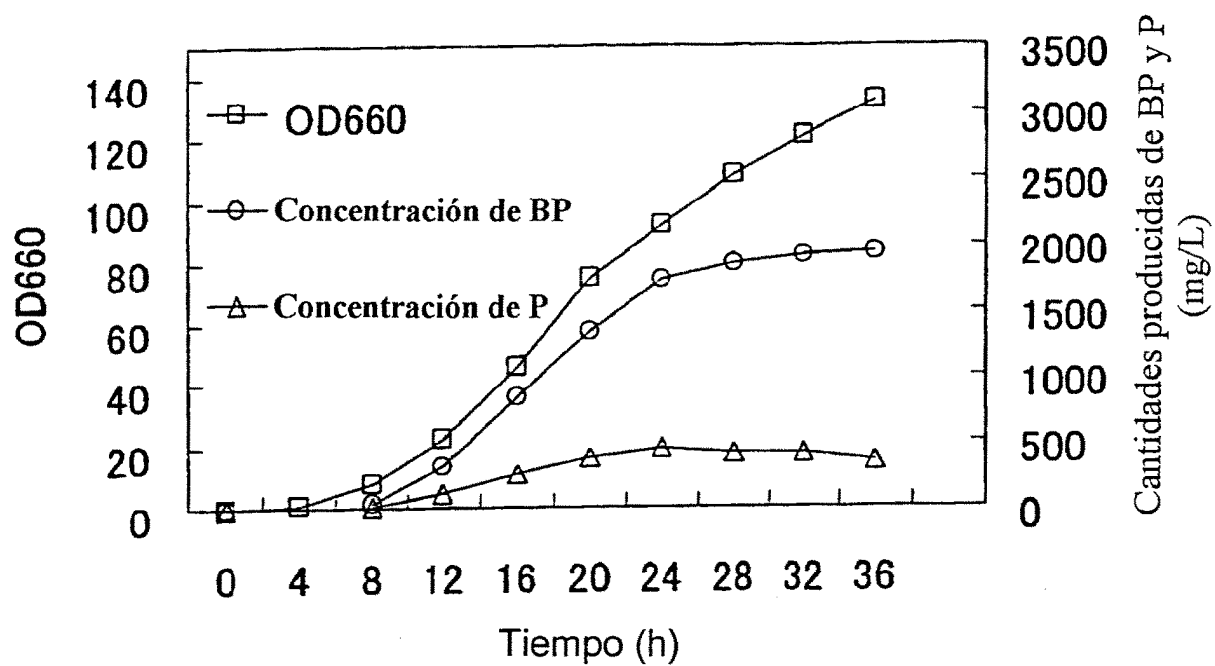


Fig. 19

Preparación de pMW218-guaBA

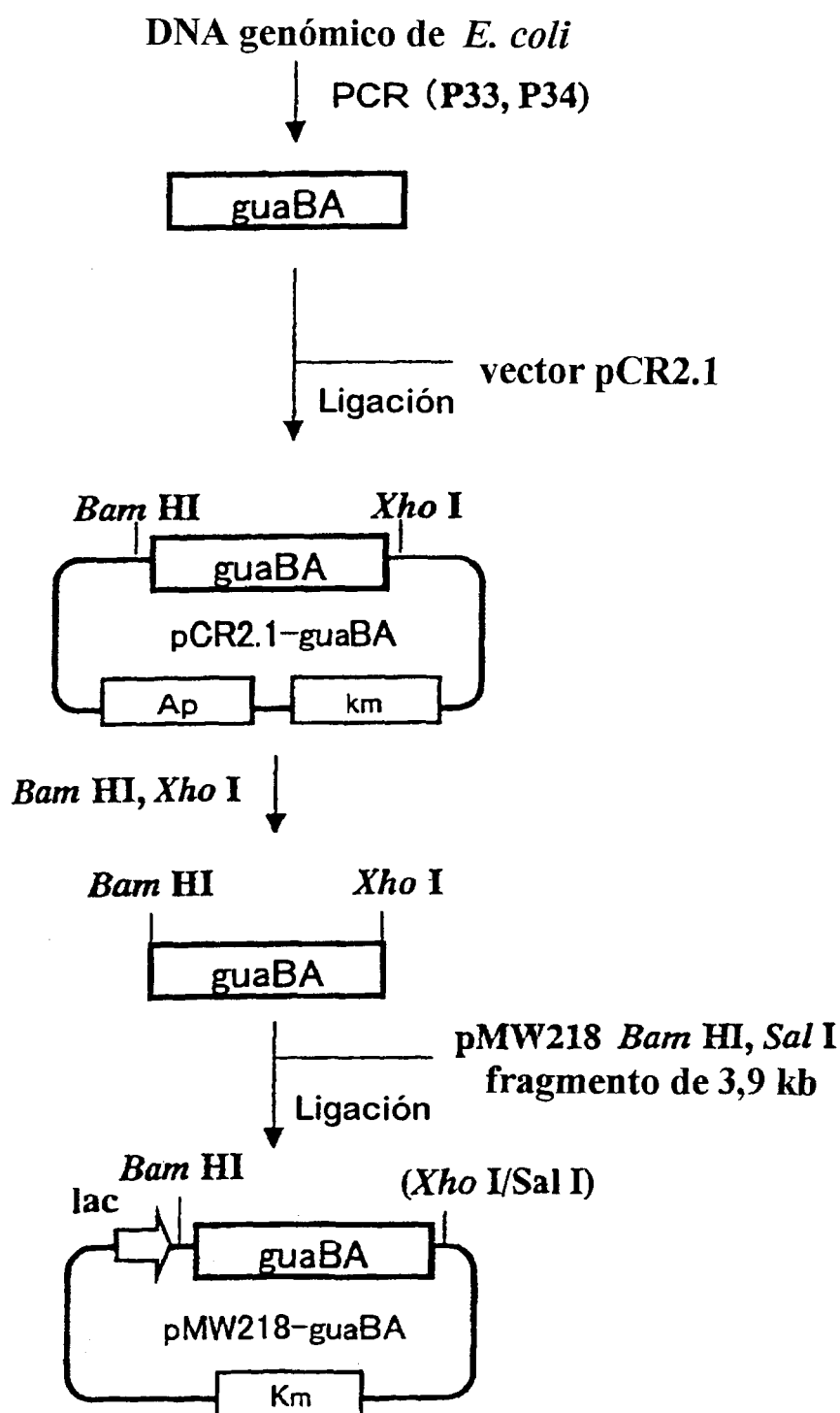


Fig. 20

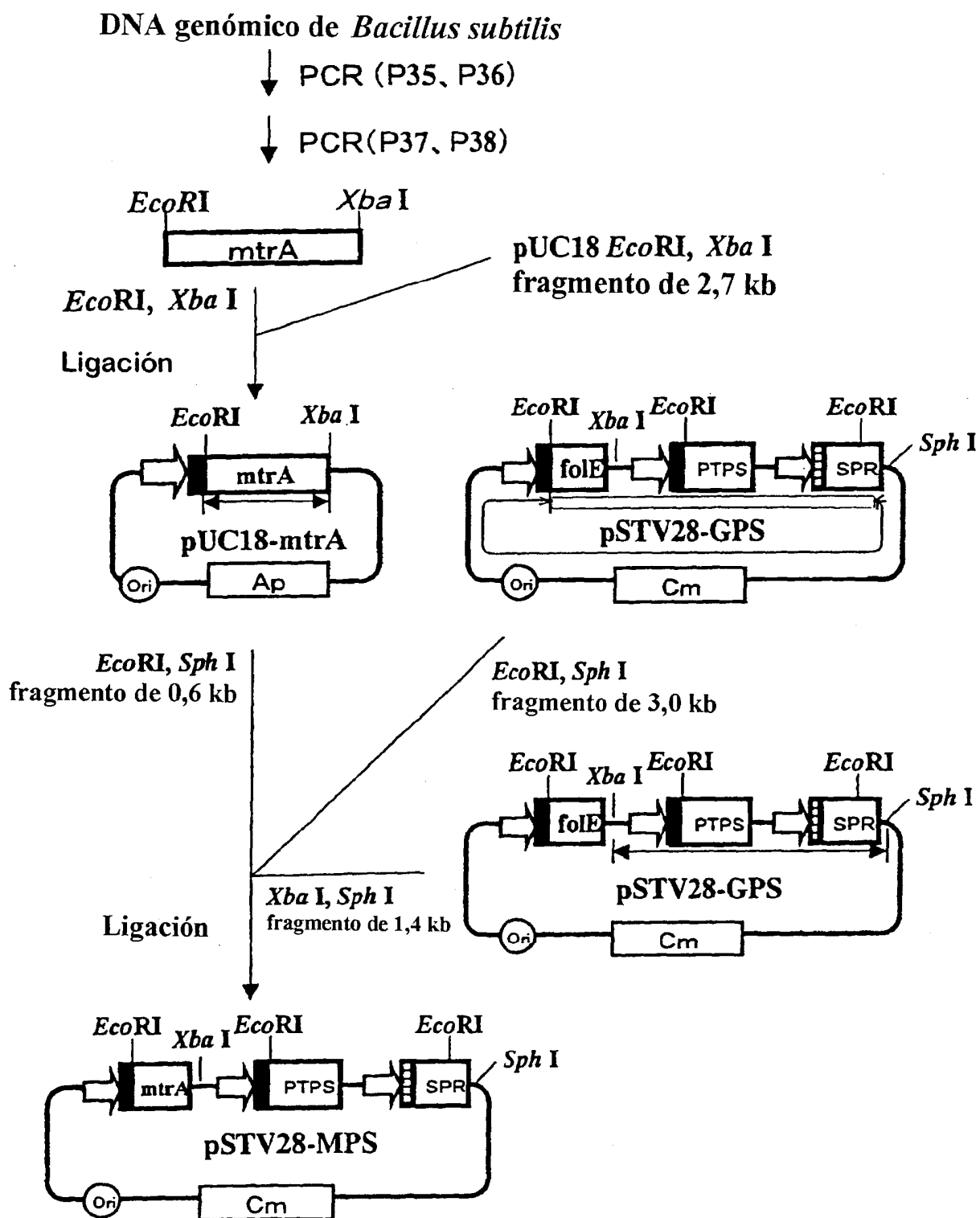


Fig. 21

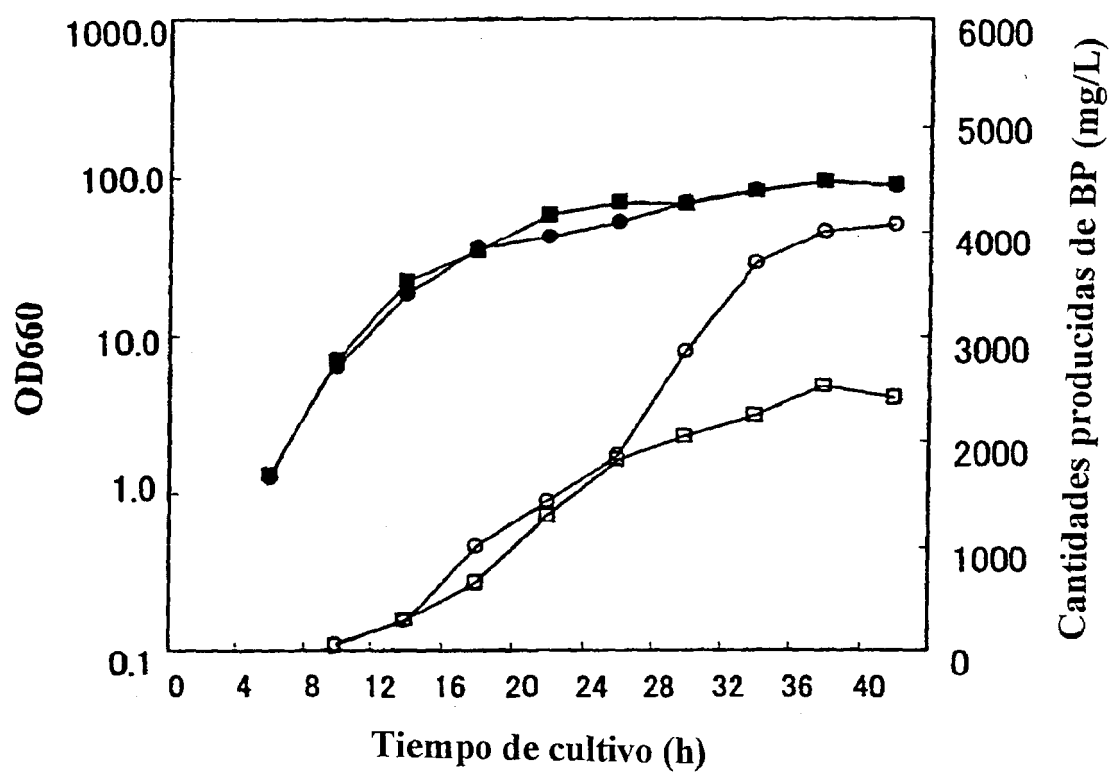


Fig. 22

Preparación de pUC18SD

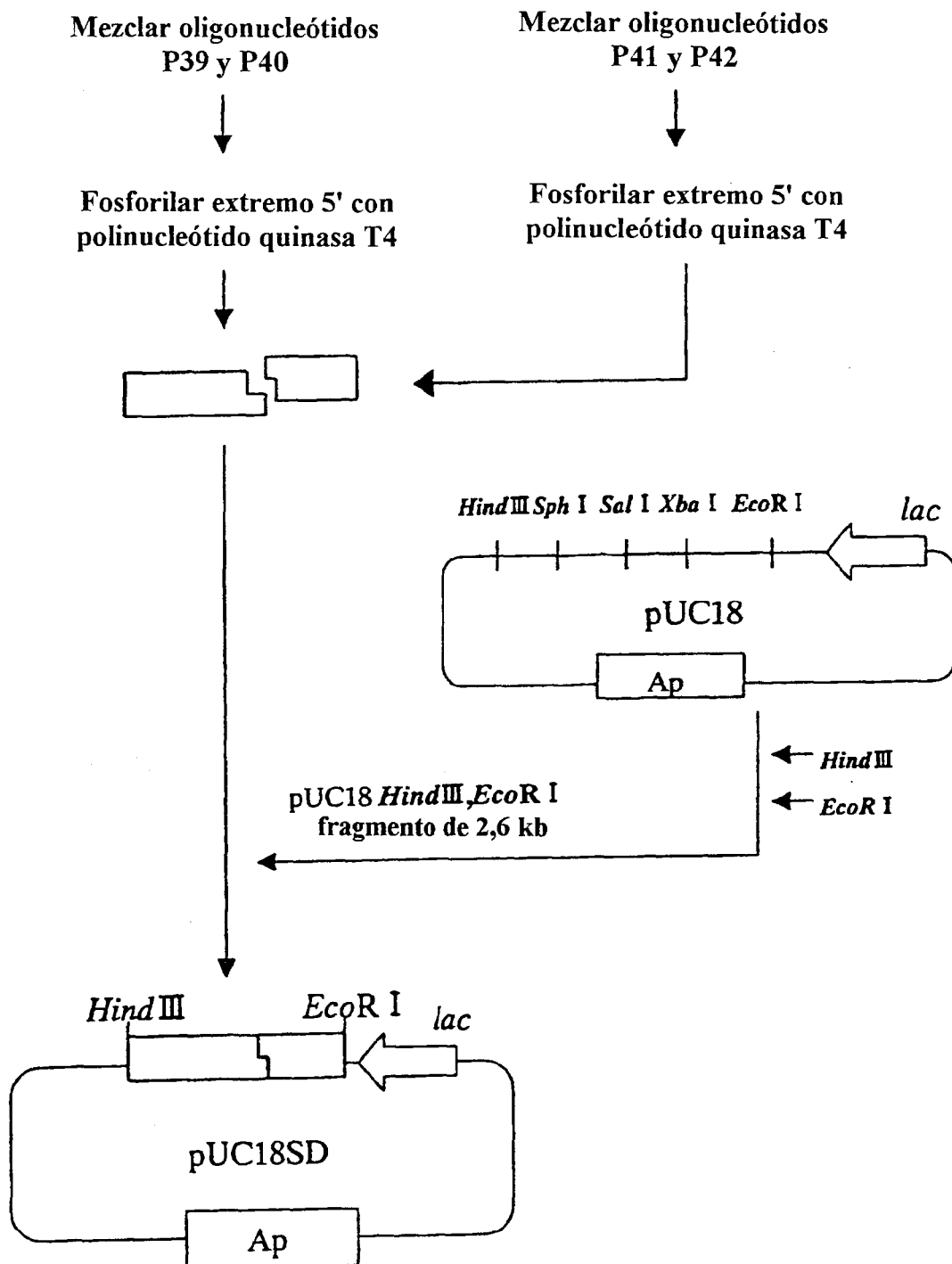


Fig. 23

Preparación de pUC18ΔE

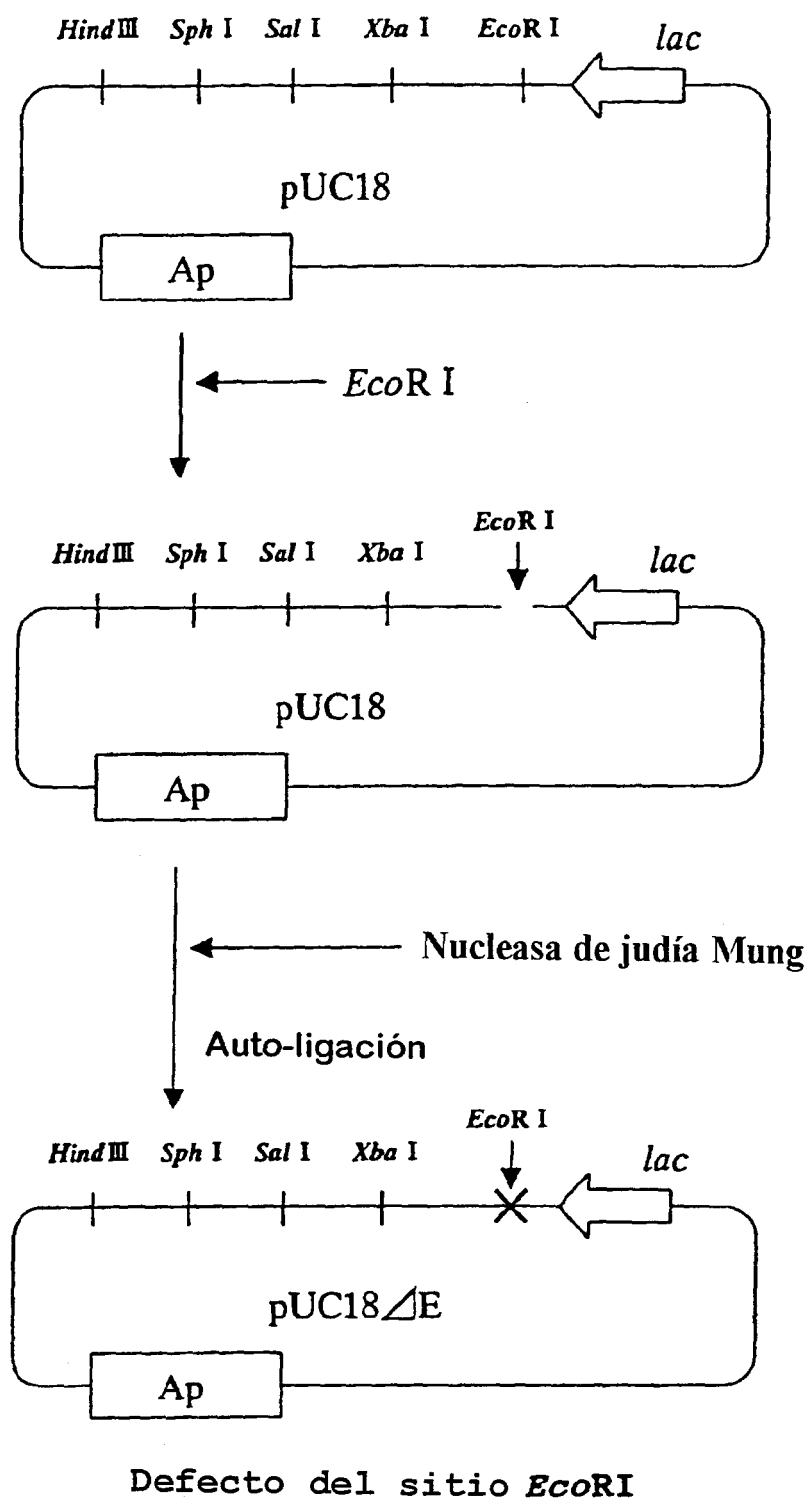


Fig. 24

Preparación de pUC18ΔESDmtrA

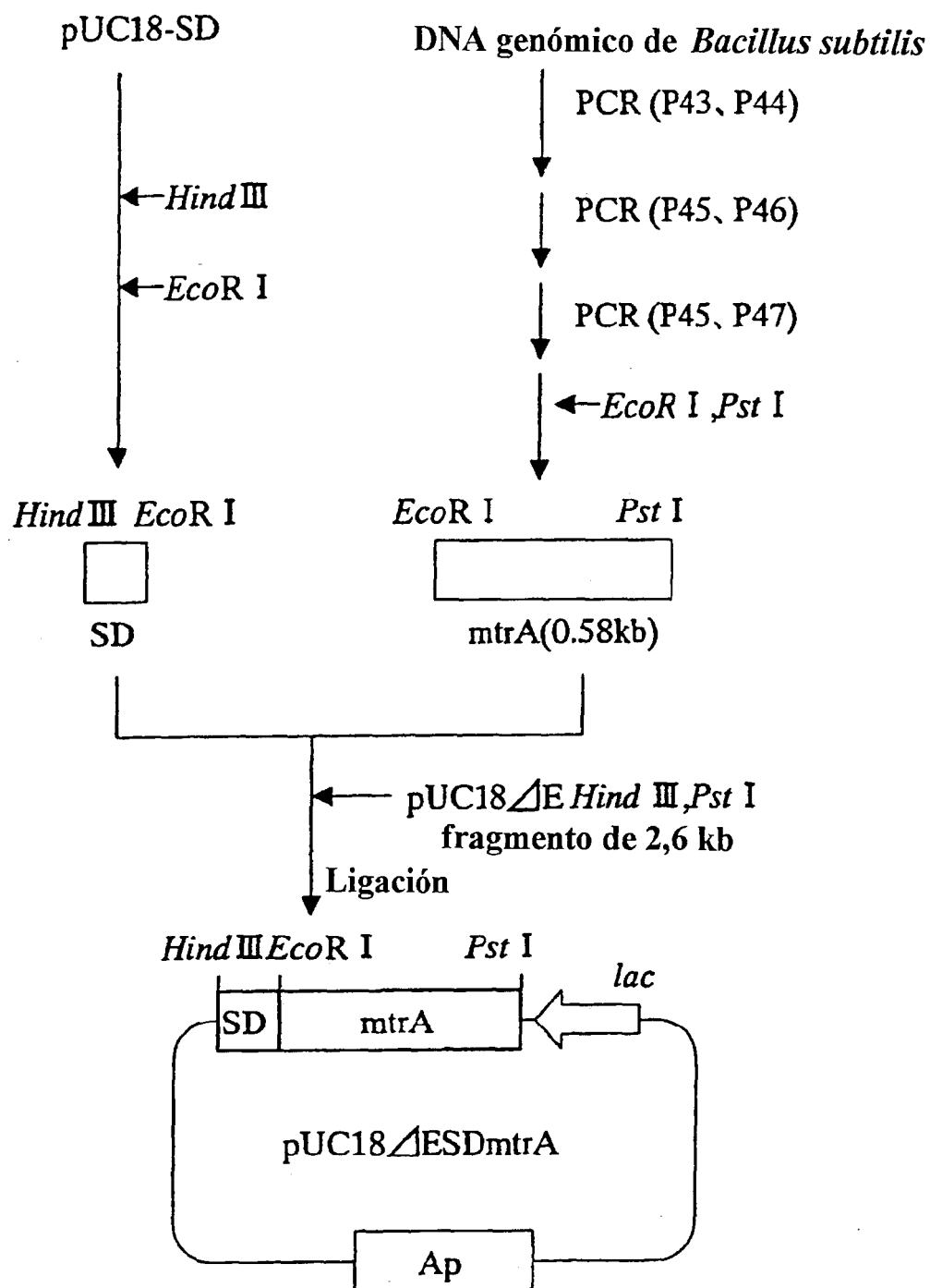


Fig. 25

Preparación de pUC18SDPTPS

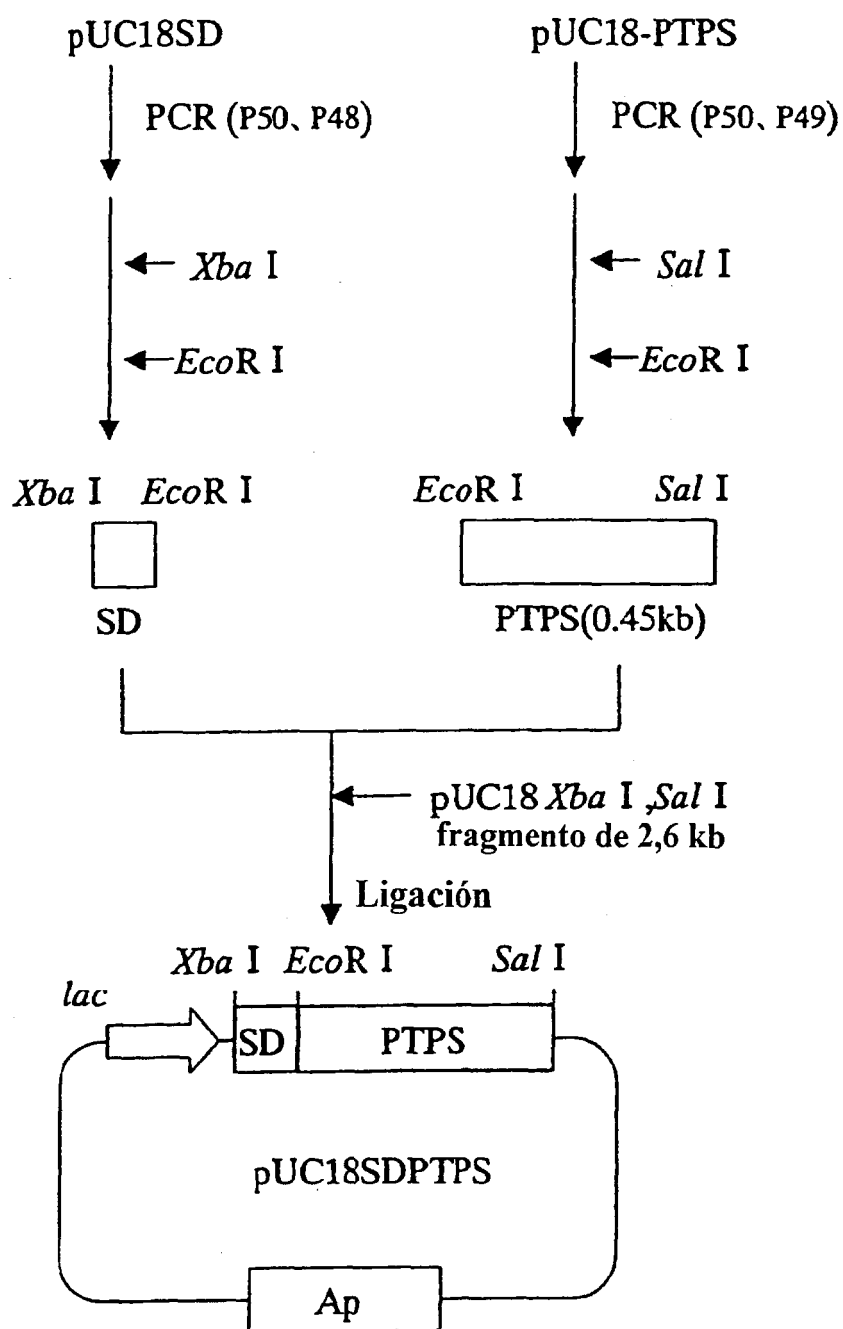


Fig. 26

Preparación de pUC18 Δ ESDSPR

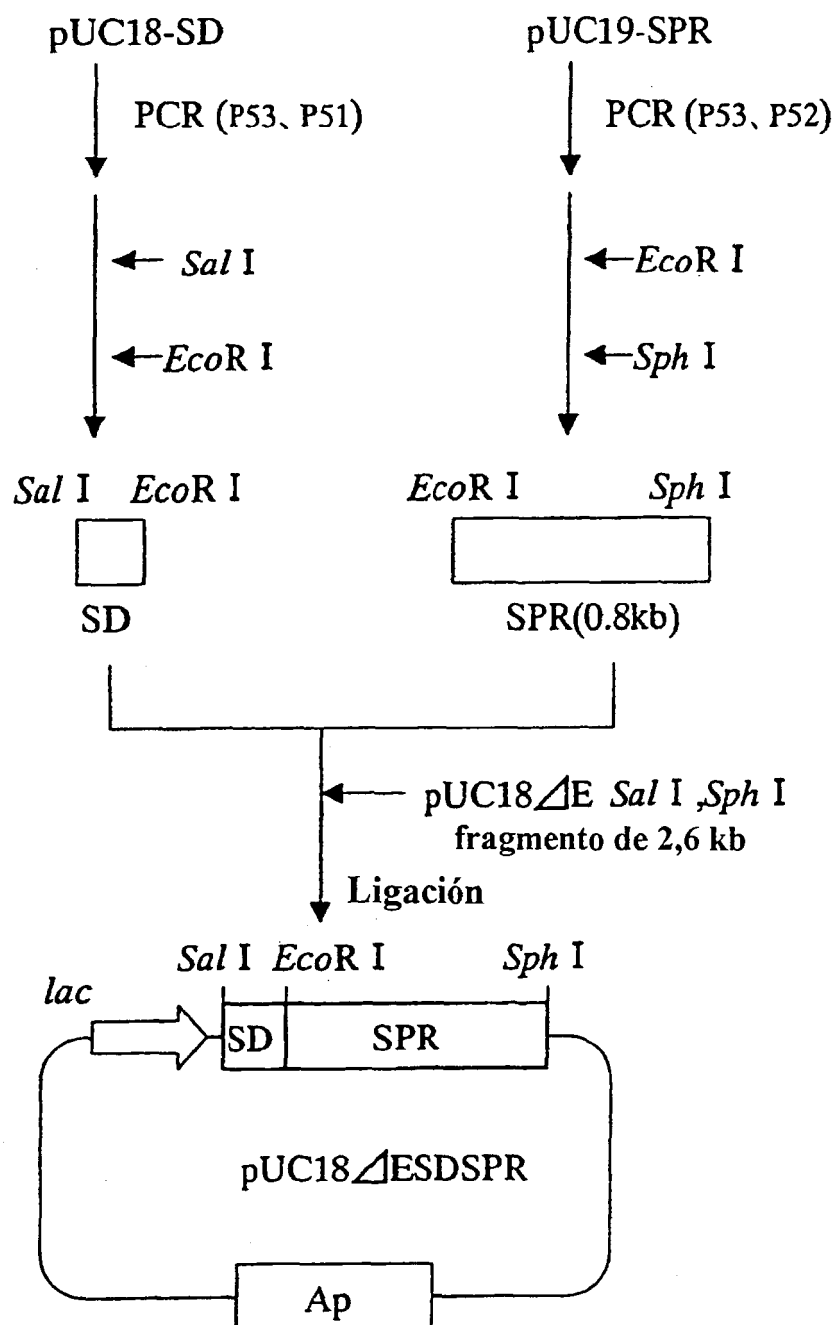


Fig. 27

Preparación de pSL1180PS

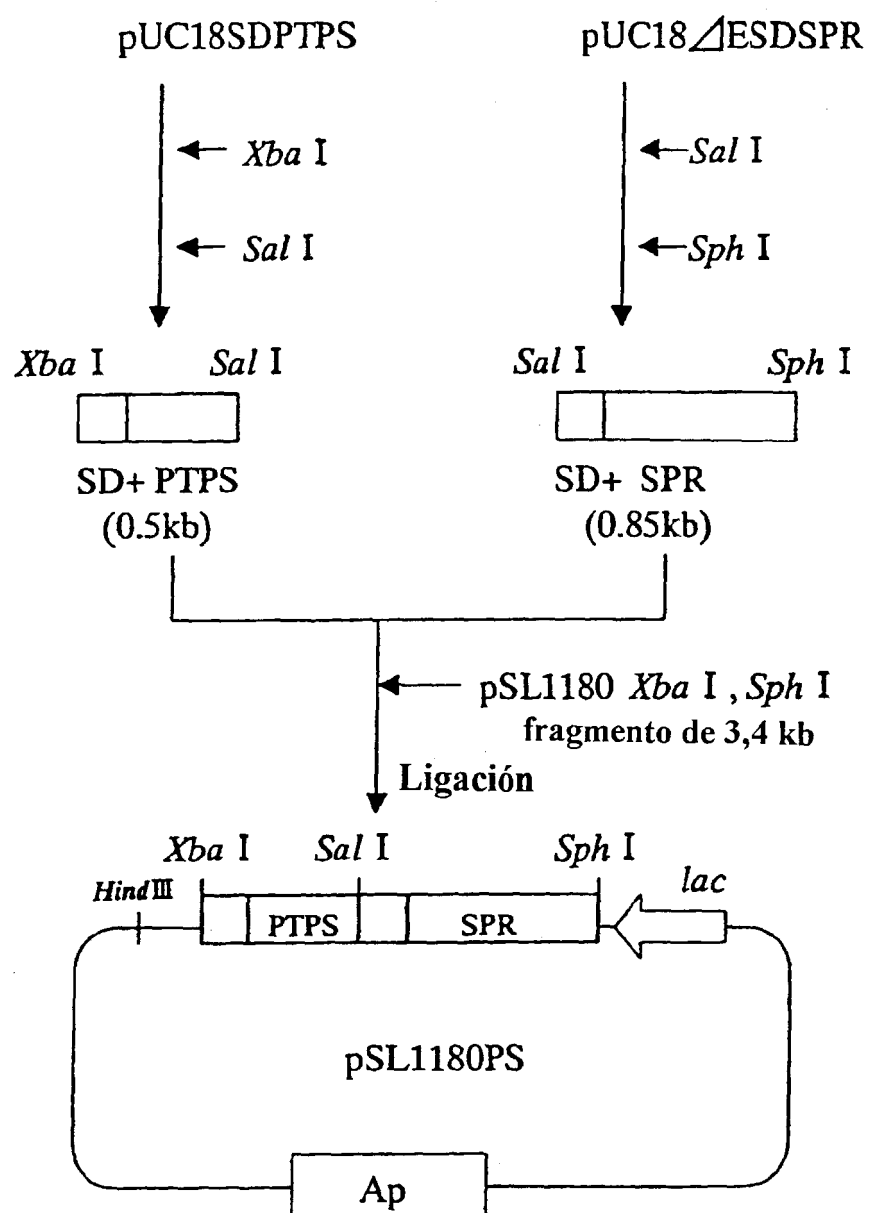


Fig. 28

Preparación de pSL1180MPS

pUC18/ESDMtrA

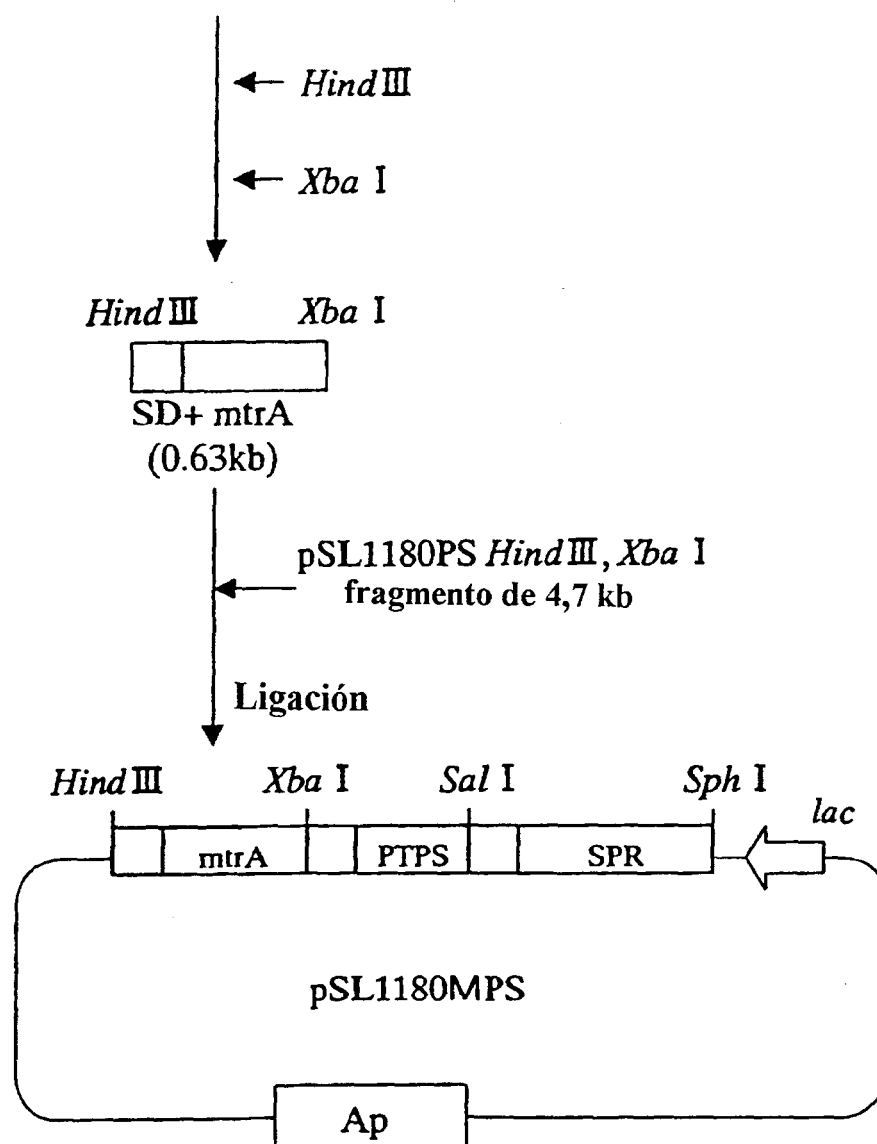


Fig. 29

Preparación de pDG148MPS

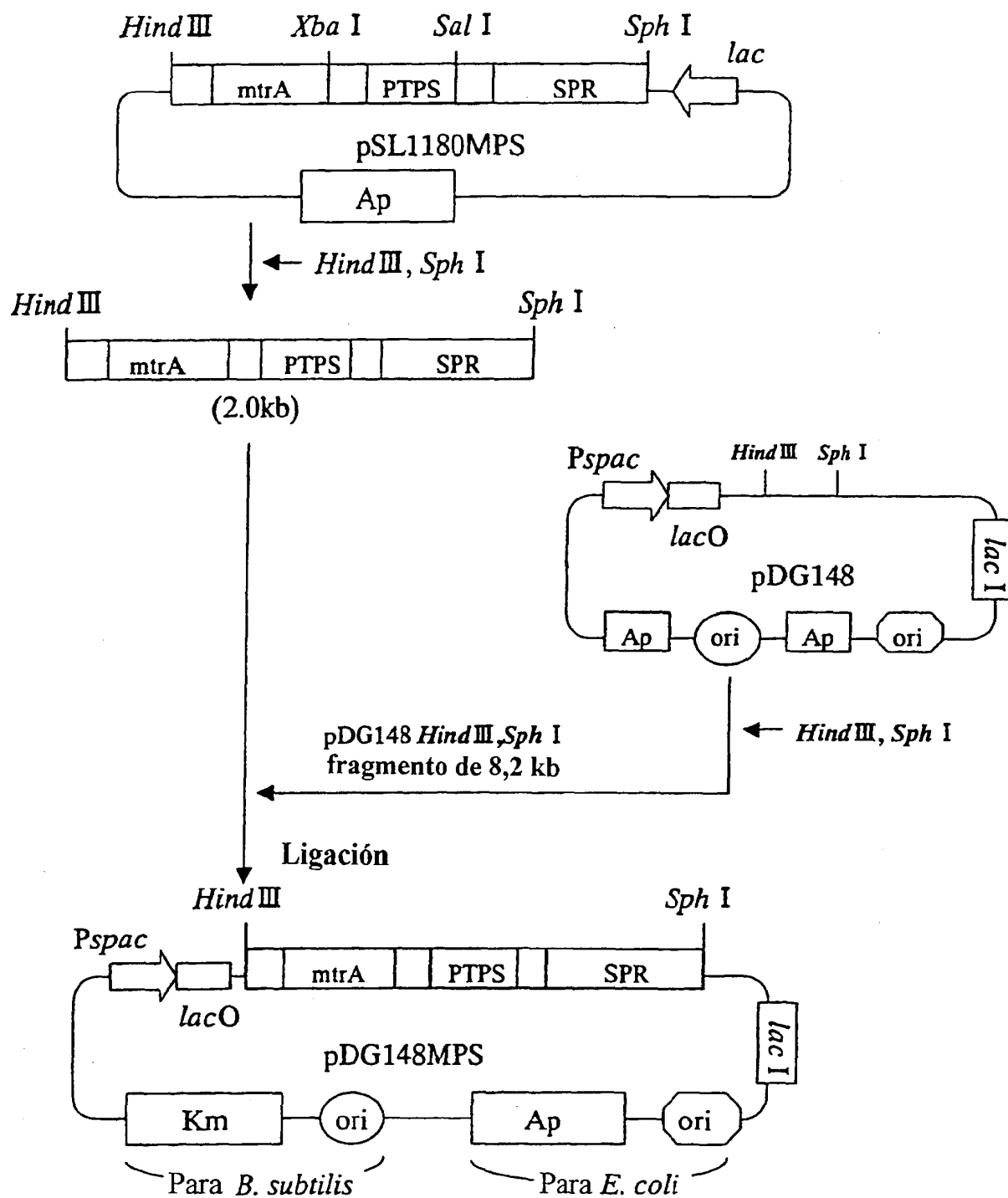


Fig. 30

Preparación de pDG148MPSΔI

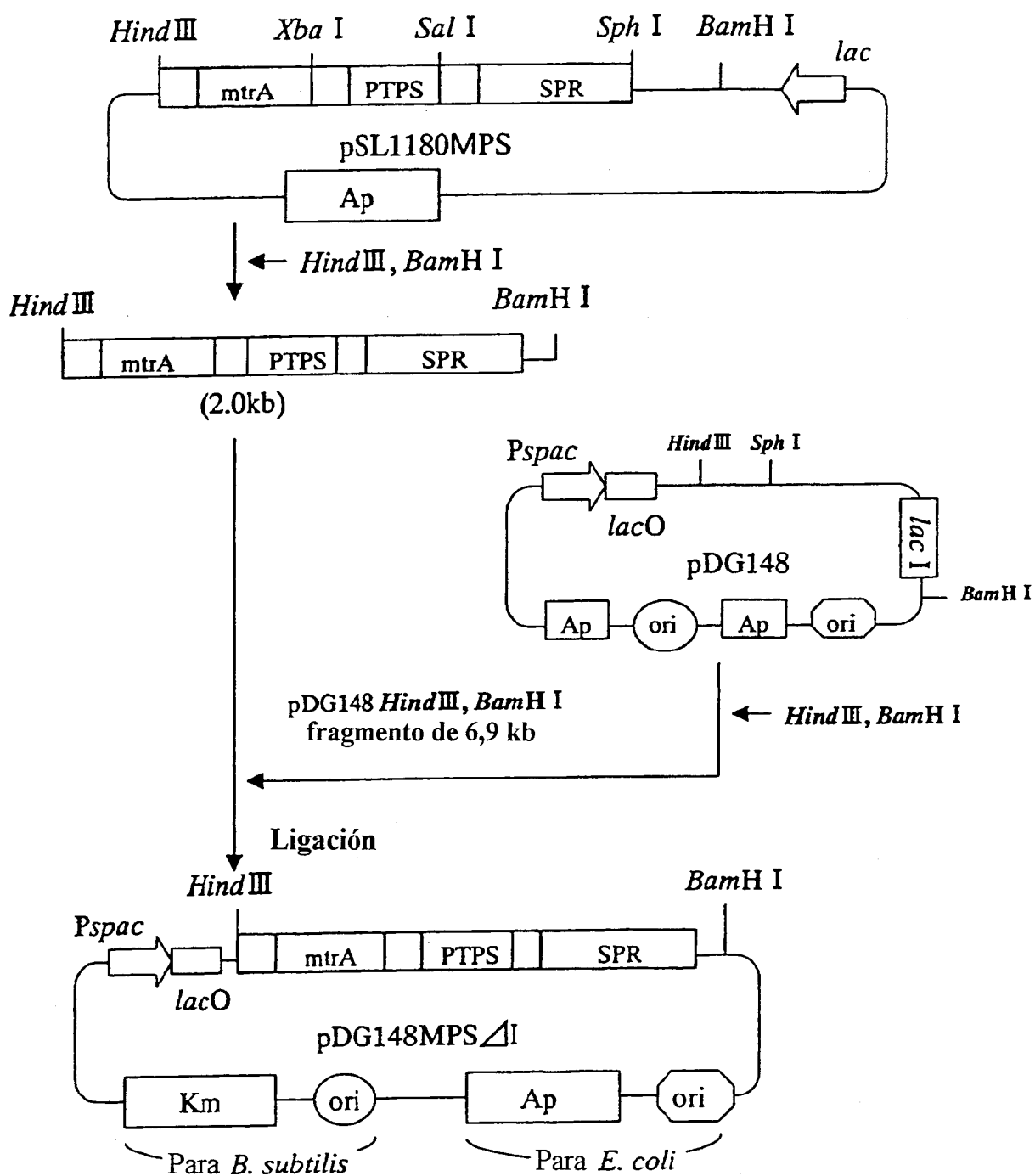


Fig. 31

ATGAGCAATATTACGAATTCCATGAAAGAAGTTAATAAAGAGCAAATCGAACAAGCTGTT 60
M S N I T N S M K E V N K E Q I E Q A V
 CGTCAAATTTTAGAAGCGATCGGAGAAGACCCGAATAGAGAAGGGCTTCTTGATACTCCG 120
 R Q I L E A I G E D P N R E G L L D T P
 AAAAGAGTCGCAAAGATGTATGCCGAAGTATTCTCCGGCTTGAATGAAGATCCAAAAGAA 180
 K R V A K M Y A E V F S G L N E D P K E
 CATTTCCAGACTATCTTCGGTGAAAACCATGAGGAGCTTGTTCTTGTAAGATATAGCG 240
 H F Q T I F G E N H E E L V L V K D I A
 TTTTATTCTATGTGTGAGCATCACCTTGTTCCCTTTTATGGAAAAGCACATGTTGCATAT 300
 F H S M C E H H L V P F Y G K A H V A Y
 ATCCCGCGAGGCGGAAAGGTCACAGGACTCAGCAAACCTGGCACGTGCCGTTGAAGCCGTT 360
 I P R G G K V T G L S K L A R A V E A V
 GCAAAGCGCCCGCAGCTTCAGGAACGCATCACTTCTACAATTGCAGAAAGCATCGTAGAA 420
 A K R P Q L Q E R I T S T I A E S I V E
 ACGCTTGATCCGCATGGCGTAATGGTAGTGGTTGAAGCGGAACACATGTGCATGACGATG 480
 T L D P H G V M V V V E A E H M C M T M
 CGCGGTGTAAGAAAACCGGGTGCGAAAACCTGTGACTTCAGCAGTCAGAGGCGTTTTTAAA 540
 R G V R K P G A K T V T S A V R G V F K
 GATGATGCCGCTGCCCCGTGCAGAAGTATTGGAACATATTAAACGCCAGGACTAA
 D D A A A R A E V L E H I K R Q D -

Fig. 32

```

ATGAGCAATATTACGAATTCATGAACGCGGCGGTTGGCCTTCGGCGCCGCGCGCGATTG 60
M S N I T N S M N A A V G L R R R A R L
TCGCGCCTCGTGTCTTCAGCGCGAGCCACCGGCTGCACAGCCCATCTCTGAGTGCTGAG 120
S R L V S P S A S H R L H S P S L S A E
GAGAACTTGAAAAGTGTGGGAAATGCAACAATCCGAATGGCCATGGGCACAACCTATAAA 180
E N L K V F G K C N N P N G H G H N Y K
GTTGTGGTGACAATTCATGGAGAGATCGATCCGGTTACAGGAATGGTTATGAATTTGACT 240
V V V T I H G E I D P V T G M V M N L T
GACCTCAAAGAATACATGGAGGAGGCCATTATGAAGCCCCTTGATCACAAGAACCTGGAT 300
D L K E Y M E E A I M K P L D H K N L D
CTGGATGTGCCATACTTTGCAGATGTTGTAAGCACGACAGAAAATGTAGCTGTCTATATC 360
L D V P Y F A D V V S T T E N V A V Y I
TGGGAGAACCCTGCAGAGACTTCTTCCAGTGGGAGCTCTCTATAAAGTAAAAGTGATGAA 420
W E N L Q R L L P V G A L Y K V K V Y E
ACTGACAACAACATTGTGGTCTACAAAGGAGAATAG
T D N N I V V Y K G E -

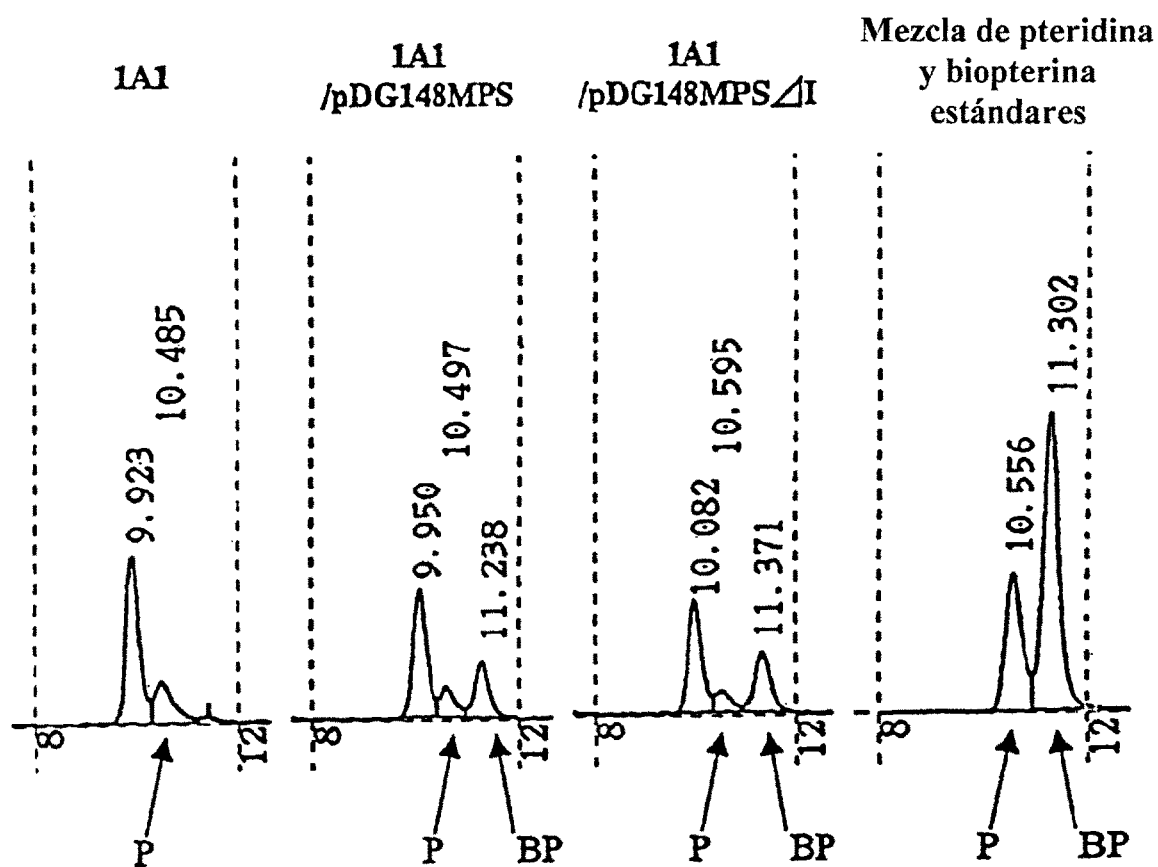
```

Fig. 33

ATGAGCAATATTACGAATTCCGGCAGGCTAGGTTGCGCTGTCTGCGTGCTGACCGGGGCT 60
M S N I T N S G R L G C A V C V L T G A
TCCCGGGGCTTCGGCCGCGCCCTGGCCCCGCAGCTGGCCGGGTTGCTGTGCGCCGGTTTCG 120
S R G F G R A L A P Q L A G L L S P G S
GTGTTGCTTCTAAGCGCACGCAGTGACTCGATGCTGCGGCAACTGAAGGAGGAGCTCTGT 180
V L L L S A R S D S M L R Q L K E E L C
ACGCAGCAGCCGGGCCTGCAAGTGGTGCTGGCAGCCGCCGATTTGGGCACCGAGTCCGGC 240
T Q Q P G L Q V V L A A A D L G T E S G
GTGCAACAGTTGCTGAGCGCGGTGCGCGAGCTCCCTAGGCCCGAGAGGCTGCAGCGCCTC 300
V Q Q L L S A V R E L P R P E R L Q R L
CTGCTCATCAACAATGCAGGCACTCTTGGGGATGTTTCCAAAGGCTTCCTGAACATCAAT 360
L L I N N A G T L G D V S K G F L N I N
GACCTAGCTGAGGTGAACAACTACTGGGCCCTGAACCTAACCTCCATGCTCTGCTTGACC 420
D L A E V N N Y W A L N L T S M L C L T
ACCGGCACCTTGAATGCCTTCTCCAATAGCCCTGGCCTGAGCAAGACTGTAGTTAACATC 480
T G T L N A F S N S P G L S K T V V N I
TCATCTCTGTGTGCCCTGCAGCCTTTCAAGGGCTGGGGACTCTACTGTGCAGGGAAGGCT 540
S S L C A L Q P F K G W G L Y C A G K A
GCCCAGACATGTTATACCAGGTCCTGGCTGTTGAGGAACCCAGTGTGAGGGTGCTGAGC 600
A R D M L Y Q V L A V E E P S V R V L S
TATGCCCCAGGTCCCCTGGACACCAACATGCAGCAGTTGGCCCCGGGAAACCTCCATGGAC 660
Y A P G P L D T N M Q Q L A R E T S M D
CCAGAGTTGAGGAGCAGACTGCAGAAGTTGAATTCTGAGGGGGAGCTGCTGCACTGTGGG 720
P E L R S R L Q K L N S E G E L V D C G
ACTTCAGCCCAGAACTGCTGAGCTTGCTGCAAAGGGACACCTTCCAATCTGGAGCCCAC 780
T S A Q K L L S L L Q R D T F Q S G A H
GTGGACTTCTATGACATTTAA
V D F Y D I -

Fig. 34

Análisis por HPLC del sobrenadante de cultivo
del compuesto de biopterina que produce
cepas de *Bacillus subtilis*



ES 2 320 531 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> SUNTORY LIMITED	
5	<120> Proceso para producir Biopterinas	
	<130> D507F507(EP)	
10	<140> PCT/JP01/07395	
	<141> 2001-08-28	
	<150> JP 2000-262973	
15	<151> 2000-08-31	
	<160> 53	
20	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P1	
30	<400> 1	
	aaatcataaa tgccatcact c	21
35	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P2	
45	<400> 2	
	gcctttaat cagttgtgat g	21
50	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P3	
60	<400> 3	
	aaagaattca tgccatcact cagta	25
65	<210> 4	
	<211> 23	

ES 2 320 531 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador P4	
	<400> 4	
10	gcctttaac tagttgtgat gac	23
	<210> 5	
15	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador P5	
	<400> 5	
25	ccggaattcc atgccatcac tcagta	26
	<210> 6	
30	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador P6	
	<400> 6	
40	gattgtcga ctatcaggct gaaaatcttc t	31
	<210> 7	
45	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador P7	
	<400> 7	
55	cttgtgggtc ttggtctga a	21
	<210> 8	
60	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 320 531 T3

	<223> Cebador P8	
	<400> 8	
5	gggtaggtga tgactgctgt g	21
	<210> 9	
10	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador P9	
	<400> 9	
20	tttggctctga attccatgaa cgcg	24
	<210> 10	
25	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador P10	
	<400> 10	
35	tattaaaact agtatctatt ctcctttgta gac	33
	<210> 11	
40	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador P11	
	<400> 11	
50	gcccaagctt gtttgacagc ttatcatcga	30
	<210> 12	
55	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador P12	
	<400> 12	
65	gatttgctga ctatcaggct gaaaatcttc t	31

ES 2 320 531 T3

	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P13	
10	<400> 13	
	ggcaggctag gttgcgctgt c	21
15	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P14	
25	<400> 14	
	gggcttaaat gtcatagaag t	21
30	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P15	
40	<400> 15	
	aaaggatccg gcaggctagg ttgcgctgtc	30
45	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P16	
55	<400> 16	
	cctgactagt taaatgtcat agaagt	26
60	<210> 17	
	<211> 30	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 320 531 T3

	<220>		
	<223> Cebador P17		
5	<400> 17		
	atgaagcttg ggcaggctag gttgcgctgt		30
10	<210> 18		
	<211> 31		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador P18		
20	<400> 18		
	gattgtcga ctatcaggct gaaaatcttc t		31
25	<210> 19		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador P19		
35	<400> 19		
	gagcgtcgac tgagggaac gcaattaatg		30
40	<210> 20		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador P20		
50	<400> 20		
	cgcggtatcc ctattctct ttgtagacca		30
55	<210> 21		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador P21		
65	<400> 21		
	gagcggtatcc tgagcgaac gcaattaatg		30

ES 2 320 531 T3

	<210> 22	
	<211> 30	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P22	
10	<400> 22	
	cgcgcatgc ttaaagtca tagaagtcca	30
15	<210> 23	
	<211> 37	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P23	
25	<400> 23	
	ttcaaggatc ccaaaatgca taacatcaa ttagtgc	37
30	<210> 24	
	<211> 38	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P24	
40	<400> 24	
	ctattactcg agttaataca tacacgatat atcgtcgc	38
45	<210> 25	
	<211> 29	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P25	
55	<400> 25	
	gattggatcc accatgaacg cggcgggttg	29
60	<210> 26	
	<211> 29	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 320 531 T3

	<220>		
	<223> Cebador P26		
5	<400> 26		
	gcgactcgag tctattctcc ttgtagac		29
10	<210> 27		
	<211> 43		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador P27		
20	<400> 27		
	gaccgatcc accatggaag gtggcaggct aggttgcgct gtc		43
25	<210> 28		
	<211> 31		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador P28		
35	<400> 28		
	ccgcctcgag ttaaattgtca tagaagtcca c		31
40	<210> 29		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador P29		
50	<400> 29		
	atccgcatgc acggattaga agccg		25
55	<210> 30		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador P30		
65	<400> 30		
	atgtactagt ctgcgttatc ccctgattc		29

ES 2 320 531 T3

	<210> 31	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P31	
10	<400> 31	
	atccactagt acggattaga agccg	25
15	<210> 32	
	<211> 29	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P32	
25	<400> 32	
	atgtactagt ctgcgttata ccctgattc	29
30	<210> 33	
	<211> 23	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P33	
40	<400> 33	
	gtaaagtacc agtgaccgga agc	23
45	<210> 34	
	<211> 27	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P34	
55	<400> 34	
	cagctggttt aattaatcga tgtagt	27
60	<210> 35	
	<211> 23	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 320 531 T3

	<220>		
	<223> Cebador P35		
5	<400> 35		
	cagggcattc actttgcttt tag		23
10	<210> 36		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador P36		
20	<400> 36		
	ttcgcttacg caggtatcat tat		23
25	<210> 37		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador P37		
35	<400> 37		
	actacgaatt ccatgaaaga agttaataaa		30
40	<210> 38		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador P38		
50	<400> 38		
	atgcctgcag tctagacgca ttagtcctgg		30
55	<210> 39		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador P39		
65	<400> 39		
	agcttggtga tccagtaaaa ggagtggttt		30

ES 2 320 531 T3

	<210> 40	
	<211> 30	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P40	
10	<400> 40	
	cctaaaaacca ctccttttac tggatacaca	30
15	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P41	
25	<400> 41	
	taggatgacg aatattacg	19
30	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P42	
40	<400> 42	
	aattcgtaat attgctcat	19
45	<210> 43	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P43	
55	<400> 43	
	cagggcattc actttgcttt tag	23
60	<210> 44	
	<211> 23	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 320 531 T3

	<220>		
	<223> Cebador P44		
5	<400> 44		
	ttcgcttacg caggtatcat tat		23
10	<210> 45		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador P45		
20	<400> 45		
	attacgaatt ccatgaaaga agttaataaa		30
25	<210> 46		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador P46		
35	<400> 46		
	gctctagacg cattagtcct ggcgtttaat		30
40	<210> 47		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador P47		
50	<400> 47		
	atgcctgcag tctagacgca ttagtcctgg		30
55	<210> 48		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador P48		
65	<400> 48		
	gtgcctctag agtgtatcca gtaaaaggag		30

ES 2 320 531 T3

	<210> 49	
	<211> 30	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P49	
10	<400> 49	
	caggcgtcga cttcgaaagc ggccgcgact	30
15	<210> 50	
	<211> 24	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P50	
25	<400> 50	
	ctcattaggc accccaggt ttac	24
30	<210> 51	
	<211> 30	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P51	
40	<400> 51	
	gtgccgtcga cgtgtatcca gtaaaaggag	30
45	<210> 52	
	<211> 30	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P52	
55	<400> 52	
	caggcgcattg cttcgaaagc ggccgcgact	30
60	<210> 53	
	<211> 20	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 320 531 T3

<220>

<223> Cebador P53

5 <400> 53

gcaacgcaat taatgtgagt

20

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65