



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 082**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12P 19/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96914437 .7**

86 Fecha de presentación : **24.05.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0832970**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.1998**

54 Título: **Procedimiento para producir éster nucleósido-5'-fosfato.**

30 Prioridad: **25.05.1995 JP 7-149781**
26.03.1996 JP 8-94680

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **Ajinomoto Co., Inc.**
nº 15-1, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104, JP

72 Inventor/es: **Mihara, Yasuhiro;**
Utagawa, Takashi;
Yamada, Hideaki y
Asano, Yasuhisa

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir éster nucleósido-5'-fosfato.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir éster nucleósido-5'-fosfato. La presente invención también se refiere a una nueva fosfatasa ácida, a un gen que codifica la fosfatasa ácida, a un ADN recombinante que contiene el gen y a un microorganismo que hospeda el ADN recombinante, que son útiles para producir el éster nucleósido-5'-fosfato. El éster nucleósido-5'-fosfato es útil como condimento, como producto farmacéutico y una materia prima para producir tales sustancias.

Técnica anterior

Se conocen métodos de fosforilación bioquímica de un nucleósido para producir éster nucleósido-5'-fosfato, utilizando los siguientes donantes de grupos fosfato, que incluyen un método que utiliza ácido p-nitrofenilfosfórico (documento de Patente Japonesa, N° de Publicación 39-29858), un método que utiliza ácido fosfórico inorgánico (documento de Patente Japonesa N° de publicación 42-1186), un método que utiliza ácido polifosfórico (documento de Patente Japonesa puesta a disposición del público N° 53-56390), un método que utiliza ácido acetilfosfórico (documento de Patente Japonesa puesta a disposición del público N° 56-82098) y un método que utiliza adenosín trifosfato (ATP) (documento de Patente Japonesa puesta a disposición del público N° 63-230094). Sin embargo estos métodos no han sido satisfactorios para producir éster nucleósido-5'-fosfato eficazmente y de forma económica porque los sustratos que deben utilizarse son caros o porque se producen productos secundarios en la reacción.

Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado un método para producir eficazmente éster nucleósido-5'-fosfato sin producir como subproductos los isómeros 2'- y 3'-nucleótido, permitiendo que las células de un microorganismo específico actúen en condiciones ácidas, sobre un nucleósido y un donante de grupos fosfato seleccionado entre el grupo que consiste en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilfosfato o una de sus sales (documento de Patente Japonesa puesta a disposición del público N° 7-231793).

Sin embargo, incluso este método ha tenido los siguientes inconvenientes. Principalmente, por ejemplo, una parte del sustrato se degrada durante la reacción debido a una actividad degradante del nucleósido que existe desafortunadamente en pequeña cantidad en las células del microorganismo que se debe utilizar. Además, si la reacción continúa, el éster nucleósido-5'-fosfato producido y acumulado se degrada. Por lo tanto, se producen productos secundarios en la solución de la reacción y ha sido imposible obtener un rendimiento suficiente. Además, la reacción no se puede realizar si el sustrato se añade en una concentración elevada, debido a una baja actividad de transfosforilación por célula microbiana.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona adecuadamente un método para producir de forma económica y eficaz éster nucleósido-5'-fosfato. En esta memoria se describe una enzima, un gen que codifica la enzima, un ADN recombinante que contiene el gen y un microorganismo que hospeda el ADN recombinante, los cuales son útiles para el método para producir éster nucleósido-5'-fosfato.

Como resultado de varias investigaciones realizadas por los presentes inventores con el fin de desarrollar un método para producir éster nucleósido-5'-fosfato que sea más eficaz que los métodos convencionales, se ha encontrado que el éster nucleósido-5'-fosfato puede producirse eficazmente con un alto rendimiento, permitiendo que una fosfatasa ácida purificada a partir de un extracto exento de células de un microorganismo, actúe en condiciones de pH de 3,0 a 5,5 sobre un nucleósido y un donante de grupos fosfato seleccionado entre el grupo que consiste en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilfosfato o una de sus sales. Además, los presentes inventores han logrado obtener genes de tipo silvestre que codifican las fosfatasas ácidas de varias bacterias y genes que codifican las fosfatasas ácidas que tienen menor actividad fosfomonoesterasa a partir de la bacteria perteneciente al género *Morganella* y de la bacteria que pertenece al género *Escherichia*. Además, los presentes inventores han encontrado que la productividad del éster nucleósido-5'-fosfato puede mejorarse de forma notable, expresando el gen en una gran cantidad según técnicas de modificación genética. De este modo se ha completado la presente invención.

A saber, la presente invención proporciona un método para producir éster nucleósido-5'-fosfato que comprende las etapas de permitir que una fosfatasa ácida, preferentemente una fosfatasa ácida que tiene una actividad fosfomonoesterasa menor, actúe bajo una condición de pH de 3,0 a 5,5, sobre un nucleósido y un donante de grupos fosfato seleccionado entre el grupo consistente en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilfosfato o una de sus sales para producir éster nucleósido-5'-fosfato y recogerlo.

En esta memoria se describen fosfatasas ácidas mutantes que tienen menor actividad fosfomonoesterasa, genes que codifican las fosfatasas ácidas, ADN recombinantes que contienen los genes y microorganismos que hospedan el ADN recombinante.

También se describen las fosfatasa ácidas obtenidas a partir de bacterias pertenecientes al género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Serratia*, los genes que codifican las fosfatasa ácidas, los ADN recombinantes que contienen los genes y los microorganismos que hospedan el ADN recombinante.

5 La presente invención se explica más detalladamente a continuación.

<1> Preparación de la fosfatasa ácida

10 La fosfatasa ácida que se va a utilizar en la presente invención no está limitada específicamente mientras que catalice la reacción para producir éster nucleósido-5'-fosfato por transferencia del grupos fosfato al nucleósido, a partir del donante del grupos fosfato, seleccionado entre el grupo que consiste en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilsfosfato o una de sus sales, en condiciones de pH de 3,0 a 5,5. Tal fosfatasa ácida incluye preferiblemente las obtenidas a partir de microorganismos. En una realización especialmente preferida, la presente invención utiliza una enzima obtenida a partir de una bacteria que pertenece a los géneros *Morganella*,
15 *Escherichia*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Serratia*. Ejemplos representativos de tales bacterias incluyen las siguientes cepas bacterianas:

Morganella morganii NCIMB 10466

20 *Morganella morganii* IFO 3168

Morganella morganii IFO 3848

25 *Escherichia blattae* JCM 1650

Escherichia blattae ATCC 33429

Escherichia blattae ATCC 33430

30 *Providencia stuartii* ATCC 29851

Providencia stuartii ATCC 33672

35 *Enterobacter aerogenes* IFO 12010

Enterobacter aerogenes IFO 13534

Klebsiella planticola IFO 14939

40 *Klebsiella planticola* IAM 1133

Serratia ficaria IAM 13540

45 *Serratia marcescens* IAM 12143.

Se señala que la fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) es originariamente una enzima que cataliza una reacción para hidrolizar el éster fosfato en condiciones ácidas, y tiene actividad nucleotidasa para degradar el éster nucleósido-5'-fosfato producido por la reacción de transfosforilación (de aquí en adelante, la actividad nucleotidasa se denomina "actividad fosfomonoesterasa"). Incluso una fosfatasa ácida tal se puede utilizar en el método para producir éster nucleósido-5'-
50 fosfato de la presente invención. Sin embargo, para obtener éster nucleósido-5'-fosfato con un alto rendimiento, es deseable utilizar la fosfatasa ácida mutante en la que la actividad fosfomonoesterasa es menor en comparación con la fosfatasa ácida de tipo silvestre producida por la bacteria, tal y como se ha descrito anteriormente (de aquí en adelante denominada simplemente "fosfatasa ácida mutante", si es necesario).

55 La fosfatasa ácida mutante se obtiene mediante la expresión de un gen mutante obtenido mutando directamente un gen que codifica una fosfatasa ácida, tal y como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, la fosfatasa ácida mutante puede obtenerse también tratando un microorganismo que produce una fosfatasa ácida con irradiación de luz ultravioleta o con un agente mutante, utilizado generalmente para la mutación artificial, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), y cultivando un microorganismo mutado para producir una fosfatasa ácida mutante que
60 tenga menos actividad fosfomonoesterasa.

Se puede obtener una proteína que tenga actividad fosfatasa ácida a partir de los microorganismos tal y como se ha descrito anteriormente, cultivando la cepa microbiana que tiene la actividad en un medio apropiado, recogiendo las células microbianas proliferadas, rompiendo las células microbianas para preparar un extracto exento de células y
65 purificando adecuadamente la proteína a partir del mismo.

El medio para cultivar el microorganismo no se limita específicamente, por lo que puede disponerse un medio común que contenga una fuente común de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos y, opcionalmente, una

fuerza de nutrientes orgánicos. La fuerza de carbono que puede ser utilizada adecuadamente incluye, por ejemplo, sacáridos, tales como glucosa y sacarosa, alcoholes tales como glicerol y ácidos orgánicos. La fuerza de nitrógeno que puede utilizarse incluye, por ejemplo, amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso y sales de amonio. Los iones inorgánicos que pueden utilizarse adecuadamente si es necesario incluyen, por ejemplo, ion magnesio, ion fosfato, ion potasio, ion hierro e ion manganeso. La fuerza de nutrientes orgánicos que puede utilizarse adecuadamente incluye, por ejemplo, vitaminas y aminoácidos así como aquellas que las contengan, tales como extracto de levaduras, peptona, extracto de carne, líquido de maceración de maíz, hidrosilato de caseína e hidrosilato de semillas de soja.

Las condiciones del cultivo tampoco se limitan específicamente. Los microorganismos se pueden cultivar, por ejemplo, en condiciones aerobias durante aproximadamente 12 a 48 horas, controlando adecuadamente el pH y la temperatura con intervalos de pH de 5 a 8 y de temperatura de 25 a 40°C.

Las células microbianas proliferadas se pueden recoger a partir de un líquido del cultivo, por ejemplo, por centrifugación. El extracto exento de células se prepara a partir de las células microbianas recogidas, utilizando un método convencional. A saber, el extracto exento de células se obtiene rompiendo las células microbianas mediante un método tal como tratamiento con ultrasonidos, molino dyno y prensa francesa, y eliminando los residuos celulares por centrifugación.

La fosfatasa ácida se purifica a partir del extracto exento de células, utilizando una combinación adecuada de técnicas utilizadas generalmente para la purificación de enzimas, tales como el fraccionamiento con sulfato amónico, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrófoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de filtración en gel y la purificación isoeléctrica. En lo que respecta a la precipitación, no es necesariamente indispensable purificar completamente la fosfatasa ácida. Es suficiente lograr la eliminación de los contaminantes, tales como una enzima que participa en la degradación del nucleósido como sustrato.

<2> Preparación del gen de la fosfatasa ácida

Un fragmento de ADN que contiene un gen estructural que codifica la proteína que tiene la actividad fosfatasa ácida, puede clonarse a partir de, por ejemplo, células del microorganismo que tienen la actividad enzimática. El método de clonación incluye, por ejemplo, un método en el que una genoteca de expresión génica de cromosomas se escruta utilizando la actividad enzimática como índice, un método en el que se prepara un anticuerpo contra la proteína para escrutar una genoteca de expresión génica de cromosomas, y un método en el que se analiza una secuencia de aminoácidos, tal como una secuencia N-terminal de la proteína purificada, en función de la cual se prepara una sonda para escrutar una genoteca.

Específicamente, los genes que codifican la fosfatasa ácida de *Morganella morganii*, *Escherichia blattae*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella planticola*, *Serratia ficaria* o *Serratia marcescens* descritas anteriormente, pueden clonarse preparando una genoteca de expresión génica de cromosomas de cada uno de los microorganismos y escrutando la genoteca utilizando la actividad fosfatasa como índice.

A saber, se puede preparar una genoteca de expresión génica de cromosomas, preparando en primer lugar el ADN cromosómico procedente de las bacterias anteriores, degradándolo parcialmente con una enzima de restricción adecuada, ligándolo posteriormente con un vector replicable de forma autónoma en *Escherichia coli*, y transformado *Escherichia coli* con el ADN recombinante obtenido. Se puede emplear una gran variedad de enzimas de restricción para la digestión del ADN cromosómico, ajustando el tiempo de la reacción de la digestión para ajustar el grado de digestión. Se puede utilizar cualquier vector para clonar el gen, con la condición de que sea replicable autónomamente en *Escherichia coli*. Es posible utilizar, por ejemplo, pUC19, pUC118, pHSG298, pBR322 y pBluescript II.

El vector puede ligarse con el fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida para preparar el ADN recombinante realizando previamente la digestión del vector con la misma enzima de restricción que se ha utilizado para la digestión del ADN cromosómico, o con una enzima de restricción que genera un borde escindido, complementario a un borde escindido del fragmento de ADN cromosómico, y ligándolo con el fragmento de ADN utilizando una ligasa, tal como la ligasa T4 de ADN. Cualquier cepa microbiana puede utilizarse como receptor del ADN recombinante preparado, con la condición de que sea apropiada para la replicación del vector. Es posible utilizar, por ejemplo, cepas microbianas de *Escherichia coli*, tales como HB101, JM109 y DH5.

Los transformantes obtenidos de este modo se hacen crecer en un medio de agar para formar sus colonias. A continuación, cuando se vierte una solución de reacción que contiene ácido p-nitrofenilfosfórico sobre una superficie del medio para realizar la reacción, entonces una cepa que ha expresado la actividad fosfatasa, libera p-nitrofenol y presenta color amarillo. Se puede elegir un transformante que hospede un fragmento de ADN que contenga el gen que codifica la fosfatasa ácida deseada, realizando la reacción descrita anteriormente en condiciones ácidas, y seleccionando el transformante utilizando el desarrollo del color como índice.

A continuación, un ADN recombinante se recupera a partir del transformante seleccionado para analizar la estructura del fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida, ligada con el vector. Una secuencia de nucleótidos del gen que codifica la fosfatasa ácida se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 2 de la Lista de Secuencias, en el caso de un gen obtenido a partir de *Morganella morganii* NCIMB 10466, la secuencia SEQ ID NO: 9 de la Lista de Secuencias, en el caso de un gen obtenido a partir de *Escherichia blattae* JCM 1650, la secuencia SEQ ID NO: 17 de

la Lista de Secuencias en el caso de un gen obtenido a partir de *Providencia stuartii* ATCC 29851, la secuencia SEQ ID NO: 19 de la Lista de Secuencias en el caso de un gen obtenido a partir de *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, la secuencia SEQ ID NO: 21 de la Lista de Secuencias en el caso de un gen obtenido a partir de *Klebsiella planticola* IFO 14939 o la secuencia SEQ ID NO: 23 de la Lista de Secuencias en el caso de un gen obtenido a partir de *Serratia*

ficaria IAM 13540.

Las secuencias de aminoácidos deducidas de las fosfatasa ácidas codificadas por los genes anteriores, se ilustran en las secuencias SEQ ID NOs: 4, 11, 18, 20, 22 y 24. En la presente invención, se utilizan preferiblemente las fosfatasa ácidas codificadas por los genes anteriores. También se utiliza preferiblemente en la presente invención la fosfatasa ácida que comprende una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las fosfatasa ácidas codificadas por los genes anteriores. La expresión “esencialmente idéntica” significa que las secuencias de aminoácidos de las fosfatasa ácidas pueden presentar sustitución, delección, inserción o transición de uno o de varios restos de aminoácidos, sin perder la actividad para producir éster nucleósido-5'-fosfato (de aquí en adelante denominada “actividad de transfosforilación”).

<3> Preparación del gen que codifica la fosfatasa ácida mutante

La fosfatasa ácida de tipo silvestre obtenida tal y como se ha descrito anteriormente, tiene actividad fosfomonoesterasa. Por lo tanto, la actividad fosfomonoesterasa puede servir como un factor que produzca la degradación acompañante del producto, a medida que el tiempo de reacción transcurra en la producción del éster nucleósido-5'-fosfato, lo que da como resultado una disminución del rendimiento de la reacción. Con el fin de superar tal circunstancia, es ventajoso producir una mutación artificial en el gen que codifica la fosfatasa ácida, de manera que disminuya la actividad fosfomonoesterasa.

Los métodos de mutagénesis dirigida al sitio para producir la mutación deseada en un lugar deseado del ADN incluyen, por ejemplo, un método que utiliza la PCR [Higuchi, R., 61, en *PCR Technology*, Erlich, H. A. compiladores, Stockton Press (1989); Carter, P., *Meth. in Enzymol.*, 154, 382 (1987)] y un método que utiliza un fago (Kramer, W. y Frits, H. J., *Meth. in Enzymol.*, 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. y col., *Meth. in Enzymol.* 154, 367 (1987)).

La fosfatasa ácida mutante que tiene la actividad fosfomonoesterasa disminuida se ejemplifica por la fosfatasa ácida que comprende una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo consistente en las secuencias ilustradas por las secuencias SEQ ID NOs: 4, 11, 18, 20, 22 y 24 de la Lista de Secuencias, y tiene una mutación que disminuye la actividad fosfomonoesterasa de la fosfatasa ácida de tipo silvestre. Concretamente, la fosfatasa ácida mutante que tiene la actividad fosfomonoesterasa disminuida se ejemplifica para la enzima obtenida a partir de *Morganella morganii* NCIMB 10466, con una en la que el resto 72° de glicina y/o el resto 151° de isoleucina, se sustituye con otro resto aminoácido en una secuencia de aminoácidos ilustrada en la secuencia SEQ ID N°: 4 en la Lista de Secuencias. En los Ejemplos descritos a continuación, un gen que codifica la fosfatasa ácida mutante se ilustra como un ejemplo en el que el resto 72° de glicina se sustituye con un resto de ácido aspártico, y el resto 151° de isoleucina se sustituye con un resto de treonina. Por otro lado, la fosfatasa ácida que tiene una actividad fosfomonoesterasa disminuida se ejemplifica, para la enzima obtenida a partir de *Escherichia blattae* JCM 1650, por una en la que el resto 74° de glicina y/o el resto 153° de isoleucina se sustituye por otro resto de aminoácido en una secuencia de aminoácidos ilustrada en la secuencia SEQ ID NO: 11 de la Lista de Secuencias. En los Ejemplos descritos a continuación, un gen que codifica la fosfatasa ácida mutante se ilustra como un ejemplo en el que el resto 74° de glicina se sustituye con un resto de ácido aspártico, y el resto 153° de isoleucina se sustituye por un resto de treonina.

Por lo tanto, el nucleótido puede sustituirse en el lugar específico del gen de tipo silvestre, según el método de mutagénesis dirigida al sitio descrito anteriormente, de manera que se codifiquen estas fosfatasa ácidas mutantes. La mutación para disminuir la actividad fosfomonoesterasa es adecuadamente un tipo de mutación en la que la actividad para producir éster nucleósido-5'-fosfato no disminuye esencialmente en comparación con la fosfatasa ácida de tipo silvestre. Sin embargo, incluso en el caso en el que la actividad para producir éster nucleósido-5'-fosfato disminuya, será suficiente si el grado de disminución de la actividad fosfomonoesterasa es mayor que el de la actividad para producir éster nucleósido-5'-fosfato, dando como resultado que la relación entre la actividad fosfomonoesterasa y la actividad para producir éster nucleósido-5'-fosfato de la fosfatasa ácida mutante disminuye en comparación con la de la fosfatasa ácida de tipo silvestre. Como el grado de disminución de la actividad fosfomonoesterasa, la actividad se puede disminuir hasta menos de aproximadamente 40% de la actividad de la enzima de tipo silvestre. Tal y como se ilustra a continuación en las realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa ácida de *Escherichia blattae* JCM 1650 es altamente homóloga a la de *Morganella morganii* NCIMB 10466, y el resto 72° de glicina y el resto 151° de isoleucina en una secuencia de aminoácidos ilustrada por la secuencia SEQ ID NO: 4 se corresponden con el resto 74° de glicina y el resto 153° de isoleucina en una secuencia de aminoácidos ilustrada por la secuencia SEQ ID NO: 11, respectivamente. Adicionalmente, además de *Escherichia blattae* JCM 1650, las secuencias de aminoácidos de las fosfatasa ácidas obtenidas a partir de microorganismos tales como de *Providencia stuartii* ATCC 29851, *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, *Klebsiella planticola* IFO 14939 y *Serratia ficaria* IAM 13450, tienen una gran homología con la de *Morganella morganii* NCIMB 10466, y las secuencias de aminoácidos de estas fosfatasa ácidas incluyen restos de aminoácidos que se corresponden cada uno de ellos con el resto 72° de glicina y el resto 151° de isoleucina, en una secuencia de aminoácidos ilustrada por la secuencia SEQ ID N°: 4, respectivamente. Por lo tanto, los genes que codifican las fosfatasa ácidas mutantes obtenidas a partir de estos microorganismos, pueden obtenerse tal y como se ha descrito anteriormente. El resto 92° de glicina y el resto 171° de isoleucina en la secuencia de aminoácidos

de la fosfatasa ácida obtenida a partir de la *Providencia stuartii* ATCC 29851, *Enterobacter aerogenes* IFO 12010 o *Klebsiella planticola* IFO 14939 ilustradas en las secuencias SEQ ID NO: 18, 20 ó 22 y el resto 88° de glicina y el resto 167° de isoleucina en la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa ácida obtenida a partir de *Serratia ficaria* IAM 13450 ilustrada en la secuencia SEQ ID NO: 24, respectivamente, se corresponden con el resto 72° de glicina y el resto 151° de isoleucina en la secuencia de aminoácidos ilustrada en la secuencia SEQ ID NO: 4.

<4> Introducción del gen de la fosfatasa ácida en el hospedador

Se puede obtener un microorganismo recombinante para expresar la actividad fosfatasa ácida a un alto nivel, introduciendo el fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la proteína que tiene la actividad fosfatasa ácida, obtenido tal y como se ha descrito anteriormente, en células de un hospedador después de recombinar de nuevo el fragmento de ADN con un vector apropiado. En tal procedimiento, la fosfatasa ácida de tipo silvestre se expresa utilizando el gen que codifica la fosfatasa ácida de tipo silvestre, mientras que la fosfatasa ácida mutante se expresa utilizando el gen que codifica la fosfatasa ácida mutante.

El hospedador incluye las cepas microbianas de *Escherichia coli*, tales como HB101, JM109 y DH5 descritas anteriormente. Además de estas cepas, se puede utilizar cualquier bacteria como hospedador, con la condición de que el origen de replicación del ADN recombinante construido y el gen de la fosfatasa ácida realicen sus funciones, el ADN recombinante sea replicable y el gen de la fosfatasa ácida sea expresable. Uno de los hospedadores más preferidos es *Escherichia coli* JM109.

El vector en el que se incorpora el gen que codifica la fosfatasa ácida, no se limita específicamente, con la condición de que sea replicable en el hospedador. Cuando se utiliza *Escherichia coli* como hospedador, el vector puede ejemplificarse mediante plásmidos replicables autónomamente en esta bacteria. Por ejemplo, es posible utilizar plásmidos de tipo ColE1, plásmidos de tipo p15A, plásmidos de tipo factor R y plásmidos de tipo fago. Tales plásmidos incluyen específicamente, por ejemplo, pBR322 (*Gene*, 2, 95 (1997)), pUC19 (*Gene*, 33, 103 (1985)), pU119 (*Methods in Enzymology*, 153, 3 (1987)), pACYC184 (*J. Bacteriol.*, 134, 1141 (1978)) y pSC101 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 3.240 (1973)).

Cuando el fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida, contiene un promotor que es funcional en el hospedador, el fragmento de ADN puede ligarse con el vector tal como es. Cuando el fragmento de ADN no contiene tal promotor, otro promotor que actúe en el microorganismo hospedador, tal como lac, trp y PL, puede ligarse en una posición aguas arriba del gen. Incluso cuando el fragmento de ADN contiene el promotor, el promotor puede sustituirse por otro promotor con el fin de expresar eficazmente el gen que codifica la fosfatasa ácida.

No hay una limitación especial para el método de introducción en el hospedador el ADN recombinante construido ligando el vector con el fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida. El ADN recombinante puede introducirse en el hospedador utilizando un método convencional. Cuando se utiliza *Escherichia coli* como hospedador, es posible utilizar, por ejemplo, el método del cloruro de calcio [*J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)], el método de Hanahan [*J. Mol. Biol.*, 166, 557 (1983)], el método de SEM [*Gene*, 96, 23 (1990)] el método de Chung y col. [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 2.172 (1989)] y la electroporación [*Nucleic Acids Res.*, 16, 6.127 (1988)].

El gen de la fosfatasa ácida puede insertarse en el ADN del vector replicable autónomamente, el cual puede introducirse en el hospedador de manera que es albergado por el hospedador como ADN extracromosómico, tal y como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, el gen de la fosfatasa ácida puede incorporarse en un cromosoma del microorganismo hospedador, conforme con un método que utiliza la transducción, el transposón (*Biotechnol.*, 1, 417 (1983)), el fago Mu (documento de Patente Japonesa puesta a disposición del público N° 2-109.985) o la recombinación homóloga [*Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. (1972)].

<5> Expresión del gen de la fosfatasa ácida en el microorganismo recombinante

El transformante obtenido tal y como se ha descrito anteriormente, en el que se ha introducido el ADN recombinante que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida, es capaz de expresar la actividad fosfatasa ácida a un alto nivel en sus células, cultivándolas en un medio apropiado que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos y opcionalmente una fuente de nutrientes orgánicos. La fuente de carbono que puede ser utilizada adecuadamente incluye, por ejemplo, carbohidratos tales como glucosa, alcoholes tales como glicerol y ácidos orgánicos. La fuente de nitrógeno que puede utilizarse incluye, por ejemplo, amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso y sales de amonio. Los iones inorgánicos que pueden ser utilizados adecuadamente si es necesario incluyen, por ejemplo, ion magnesio, ion fosfato, ion potasio, ion hierro e ion manganeso. La fuente de nutrientes orgánicos que puede ser utilizada adecuadamente incluye, por ejemplo, vitaminas y aminoácidos así como aquellas que las contienen, tales como extracto de levadura, peptona, extracto de carne, líquido de maceración de maíz, hidrosilato de caseína e hidrosilato de semillas de soja. La cantidad de expresión de la actividad fosfatasa ácida puede aumentarse añadiendo al medio un agente inductor de la expresión que dependa de un promotor tal como IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido).

Las condiciones del cultivo tampoco están específicamente limitadas. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, en condiciones aerobias durante aproximadamente 12 a 48 horas, controlando el pH y la temperatura adecuadamente, con intervalos de pH de 5 a 8 y de temperatura de 25 a 40°C.

A continuación, las células microbianas se recogen del cultivo, y se obtiene por ruptura un extracto exento de células, a partir del cual se puede purificar la fosfatasa ácida. La purificación se realiza utilizando una combinación apropiada de técnicas empleadas generalmente para la purificación de enzimas, tales como las descritas en el apartado <1> anterior. En lo que se refiere a la purificación, no es necesariamente indispensable purificar completamente la fosfatasa ácida. Es suficiente lograr la eliminación de contaminantes tales como una enzima que participa en la degradación del nucleósido como sustrato.

<6> Producción del éster nucleósido-5'-fosfato

El éster nucleósido-5'-fosfato se puede producir en una mezcla de reacción permitiendo que la fosfatasa ácida obtenida tal y como se ha descrito en el apartado <1> o la fosfatasa ácida de tipo silvestre o la fosfatasa ácida mutante obtenida por la expresión del gen en una gran cantidad, de acuerdo con la técnica de modificación genética descrita en el apartado <5>, se pongan en contacto y produzcan la reacción de un nucleósido con un donante de grupos fosfato, seleccionado entre el grupo que consiste en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilsulfato o una de sus sales. Con el fin de obtener una productividad elevada en esta reacción es importante ajustar el pH de la solución de reacción para que sea débilmente ácido en un intervalo de 3,0 a 5,5.

Cuando el gen que codifica la fosfatasa ácida se expresa en gran cantidad mediante la técnica de modificación genética, especialmente cuando el gen que codifica la fosfatasa ácida mutante que tiene la actividad fosfomonoesterasa disminuida se expresa en gran cantidad, entonces es posible también producir éster nucleósido-5'-fosfato de manera económica y eficaz, utilizando un cultivo que contiene células microbianas del transformante, las células microbianas separadas y recogidas del cultivo, o un producto obtenido a partir de las células microbianas conforme a, por ejemplo, un tratamiento inmovilizador, un tratamiento con acetona o un tratamiento de liofilización, en lugar de la fosfatasa ácida purificada.

El nucleósido que debe ser utilizado incluye, por ejemplo, nucleósidos de purina, tales como inosina, guanosina, adenosina, xantosina, purina ribósida, 6-metoxipurina ribósida, 2,6-diaminopurina ribósida, 6-fluoropurina ribósida, 6-tiopurina ribósida, 2-amino-6-tiopurina ribósida y mercaptoguanosina; y nucleósidos de pirimidina tales como uridina, citidina, 5-aminouridina, 5-hidroxiuridina, 5-bromouridina y 6-azauridina. Como resultado de la reacción, estos nucleósidos de tipo natural y los nucleósidos de tipo no natural se fosforilan específicamente en sus posiciones 5', y se producen respectivamente los correspondientes ésteres nucleósido-5'-fosfato.

El nucleósido se añade adecuadamente a la solución de la reacción a una concentración de 1 a 20 g/dL. En el caso de utilizar un nucleósido que sea escasamente soluble en agua, el rendimiento de la reacción puede aumentarse añadiendo ácido bórico o un tensioactivo tal como dimetilsulfóxido.

En lo que respecta al donante de grupos fosfato que debe utilizarse, aquellos utilizables como el ácido polifosfórico o una de sus sales incluyen, por ejemplo, ácido pirofosfórico, ácido tripilfosfórico, ácido trimetafosfórico, ácido tetrametafosfórico, ácido hexametafosfórico, sus mezclas, sus sales sódicas, sus sales potásicas y mezclas de estas sales. Aquellos utilizables como ácido fenilfosfórico o una de sus sales incluyen, por ejemplo, fenilfosfato de disodio, fenilfosfato de dipotasio, anhídrido del ácido O,O-difenilfosfórico, y sus mezclas. Aquellos utilizables como carbamilsulfato o una de sus sales incluyen, por ejemplo, carbamilsulfato de disodio, carbamilsulfato de dipotasio, carbamilsulfato de diamonio, carbamilsulfato de dilitio, y sus mezclas. La concentración a la que el donante de grupos fosfato se utiliza, está determinada por la concentración del nucleósido como aceptor de grupos fosfato. El donante de grupos fosfato se utiliza generalmente en una cantidad que es de 1 a 5 veces la del nucleósido.

Se obtiene un resultado preferido en la reacción, generalmente a una temperatura de 20 a 60°C, preferiblemente de 30 a 40°C, a un pH en una zona ligeramente ácida de 3,5 a 6,5, preferiblemente de 4,0 a 5,0. La reacción puede realizarse adoptando uno cualquiera de los métodos estacionarios y métodos con agitación. El tiempo de reacción se prolonga dependiendo de las condiciones, tal como la actividad de la enzima que se va a utilizar y la concentración del sustrato, sin embargo, es de 1 a 100 horas.

El éster nucleósido-5'-fosfato producido de este modo puede recogerse y ser separado de una mezcla después de la finalización de la reacción, adoptando un método para utilizar una resina sintética para la adsorción, un método para utilizar un agente de precipitación y otros métodos convencionales de recogida y separación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la relación entre el pH de la reacción y la cantidad de ácido 5'-inosínico producida en una reacción realizada utilizando una enzima obtenida a partir de *Morganella morganii*.

La Figura 2 ilustra la relación entre el pH de la reacción y la cantidad de ácido 5'-inosínico producida en una reacción realizada utilizando una enzima obtenida a partir de *Escherichia blattae*.

La Figura 3 ilustra un mapa de enzimas de restricción de un fragmento de ADN cromosómico de *Morganella morganii* que contiene un gen que codifica una fosfatasa ácida.

La Figura 4 ilustra la cantidad de ácido 5'-inosínico producida en una reacción realizada utilizando una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa obtenido a partir de *Morganella morganii*.

La Figura 5 ilustra la cantidad de ácido 5'-inosínico producida en las reacciones realizadas empleando una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida de tipo silvestre y una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida mutante, obtenido a partir de *Morganella morganii*, respectivamente.

La Figura 6 ilustra un mapa de enzimas de restricción de un fragmento de ADN cromosómico de *Escherichia blattae* que contiene un gen que codifica una fosfatasa ácida.

La Figura 7 ilustra un diagrama que muestra la cantidad de ácido 5'-inosínico producida en una reacción realizada utilizando una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de *Escherichia blattae*.

La Figura 8 ilustra la cantidad de ácido 5'-inosínico producida en las reacciones realizadas utilizando una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida de tipo silvestre y una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida mutante obtenido a partir de *Escherichia blattae*, respectivamente.

La Figura 9 ilustra un mapa de enzimas de restricción de un fragmento de ADN cromosómico obtenido a partir de *Enterobacter aerogenes* que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida.

La Figura 10 ilustra un mapa de enzimas de restricción de un fragmento de ADN cromosómico obtenido a partir de *Klebsiella planticola* que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida.

La Figura 11 ilustra un mapa de enzimas de restricción de un fragmento de ADN cromosómico obtenido a partir de *Serratia ficaria* que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida.

La Figura 12 ilustra secuencias de aminoácidos expresadas en código de una letra, deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de las fosfatasas ácidas obtenidas a partir de *Morganella morganii*, *Escherichia blattae*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella planticola* y *Serratia ficaria*.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se explicará más detalladamente a continuación con referencia a los Ejemplos, sin embargo, la presente invención no se limita a estos Ejemplos. La actividad de transfosforilación se midió en las condiciones siguientes, utilizando inosina como sustrato. La reacción se realizó a pH 5,0 a 30°C durante 10 minutos en una solución de reacción (1 mL) que contenía 40 $\mu\text{mol/mL}$ de inosina, 100 $\mu\text{mol/mL}$ de pirofosfato de sodio, 100 $\mu\text{mol/mL}$ de un tampón de acetato de sodio (pH 5,0) y una enzima. La reacción se detuvo añadiendo 200 μL de ácido clorhídrico 2 N. A continuación, el material precipitado se eliminó por centrifugación. A continuación, el ácido 5'-inosínico producido por la reacción de transfosforilación se midió cuantitativamente. La cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ácido 5'-inosínico en 1 minuto, en las condiciones estándar de reacción, se definió como 1 unidad.

La actividad fosfomonoesterasa se midió en las siguientes condiciones, utilizando ácido 5'-inosínico como sustrato. La reacción se realizó a 30°C durante 10 minutos en una solución de reacción (1 mL) que contenía 10 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido 5'-inosínico, 100 $\mu\text{mol/mL}$ de un tampón MES/NaOH (pH 6,0) y una enzima. La reacción se detuvo añadiendo 200 μL de ácido clorhídrico 2 N. A continuación, el material precipitado se eliminó por centrifugación. A continuación, la inosina producida en la reacción hidrolítica se midió cuantitativamente. La cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de inosina en un 1 minuto, en estas condiciones estándar de reacción, se definió como 1 unidad.

La inosina y el ácido 5'-inosínico se analizaron con las condiciones siguientes, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC):

Columna: Cosmosil 5C18-AR (4,6 x 150 mm) [producida por nacalai tesque];

Fase móvil: tampón de fosfato de potasio 5 mM (pH 2,8)/metanol = 95/5;

Caudal: 1,0 mL/min;

Temperatura: temperatura ambiente;

Detección: UV 245 nm.

Incidentalmente, en la reacción para producir ésteres nucleósido-5'-fosfato utilizando nucleósidos distintos de la inosina como materia prima, los nucleósidos como materia prima y los ésteres nucleósido-5'-fosfato producidos, se analizaron por HPLC tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 1

Purificación y caracterización de la fosfatasa ácida obtenida a partir de Morganella morganii

5 Un medio nutriente (pH 7,0, 50 mL) que contenía 1 g/dL de peptona, 0,5 g/dL de extracto de levadura y 1 g/dL de cloruro de sodio, se vertió en matraces de Sakaguchi (500 mL) que se habían esterilizado a 120°C durante 20 minutos. Un cultivo inclinado de *Morganella morganii* NCIMB 10466 se inoculó en cada uno de los matraces, una vez con un asa de siembra de platino, el cual se incubó a 30°C durante 16 horas con agitación. Las células microbianas que se recogieron del cultivo por centrifugación (aproximadamente 3.000 g), se pusieron en suspensión en una solución
10 tampón de fosfato de potasio 100 mM (1 L, pH 7,0). Se realizó un tratamiento por ultrasonidos a 4°C durante 20 minutos para romper las células microbianas. La suspensión tratada se centrifugó para eliminar su fracción insoluble. Se preparó de este modo un extracto exento de células.

15 Se añadió sulfato de amonio al extracto exento de células de manera que se obtuvo un 30% de saturación. El precipitado que aparece se eliminó por centrifugación, y luego se añadió adicionalmente sulfato de amonio al material sobrenadante, de manera que se obtuvo un 60% de saturación. El material precipitado que aparece se recogió por centrifugación y se disolvió en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM.

20 Esta solución enzimática bruta se dializó cuatro veces frente a 5 L de una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y luego se aplicó a una columna de DEAE-Toyopeal 650M (Φ 4,1 x 22 cm) equilibrada con solución tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0), seguido por lavado con 800 mL de una solución tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0). La actividad de transfosforilación se encontró en una fracción que pasó a través de la columna y de este modo se recuperó la fracción.

25 Se añadió sulfato de amonio a la fracción, de manera que se obtuvo 35% de saturación, la cual se adsorbió en una columna de butil-Toyopeal (Φ 3,1 x 26 cm) equilibrada con una solución tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0) que contenía sulfato de amonio con 35% de saturación. La elución se realizó utilizando un gradiente de concentración lineal desde 35% de saturación hasta 20% de saturación en una solución tampón de fosfato de potasio (pH 7,0).

30 Las fracciones activas se recogieron y se dializaron frente a 1 L de solución tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0), seguido por aplicación a una columna de hidroxipatita (Φ 5 x 6,5 cm) equilibrada con una solución tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0). La elución se realizó utilizando un gradiente de concentración lineal desde 50 mM hasta 300 mM de solución tampón de fosfato de potasio (pH 7,0).

35 Las fracciones activas se recogieron y se concentraron por ultrafiltración. Esta solución enzimática se aplicó a una columna HiLoad TM 16/60 Superdex 200 (producida por Pharmacia). La elución se realizó con un caudal de 1,0 mL/minuto utilizando una solución tampón de fosfato de potasio 50 mM que contenía cloruro de sodio 100 mM.

40 Conforme al procedimiento descrito anteriormente, la enzima que presentaba actividad de transfosforilación, se purificó a partir del extracto exento de células en consecuencia aproximadamente 550 veces, con una relación de recuperación de aproximadamente 10%. La actividad específica y la relación de recuperación en este procedimiento de purificación, se muestran en la Tabla 1. Esta muestra enzimática era homogénea en la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

TABLA 1

Recuperación por etapas	Actividad total	Proteína total	Actividad específica	Relación
	(unidad)	(mg)	(unidad/mg)	(%)
1. Extracto exento de células	597	127.200	0,005	100
2. Fraccionamiento del sulfato de amonio (30 al 60%)	568	122.210	0,005	95
3. DEAE-Toyopearl	517	36.498	0,014	87
4. Butil-Toyopearl	394	1.121	0,351	66
5. Hidroxipatita	112	50	2,244	10
6. Superdex 200	63	24	2,630	10

ES 2 281 082 T3

La enzima purificada presentó las siguientes propiedades:

- (1) Acción: el grupos fosfato se transfiere de solo un donante de grupos fosfato, tal como ácido polifosfórico, al nucleósido y se produce el éster nucleósido-5'-fosfato. Inversamente, esta enzima también presenta actividad para hidrolizar el éster fosfato.
- (2) Especificidad de sustrato: los compuestos que sirven como donantes de grupos fosfato en la reacción de transfosforilación incluyen, por ejemplo, ácido pirofosfórico, ácido tripolifosfórico, ácido trimetafosfórico, ácido tetrametafosfórico, ácido hexametafosfórico, fenilfosfato de disodio, fenilfosfato de dipotasio, anhídrido del ácido O,O-difenilfosfórico, carbamilfosfato de disodio, carbamilfosfato de dipotasio, carbamilfosfato de diamonio, carbamilfosfato de dilitio. Los compuestos que sirven como aceptor del grupos fosfato incluyen, por ejemplo, purina ribósida, inosina, guanosina, adenosina, xantosina, uridina y citidina. Por otra parte, los compuestos que experimentan la acción en la reacción hidrolítica del éster fosfato incluyen, por ejemplo, ácido fosfórico inorgánico, tal como, ácido pirofosfórico, ácido tripolifosfórico, ácido trimetafosfórico, ácido tetrametafosfórico, ácido hexametafosfórico; éster fosfato, tal como fenilfosfato de disodio, fenilfosfato de dipotasio, anhídrido del ácido O,O-difenilfosfórico, carbamilfosfato de disodio, carbamilfosfato de dipotasio, carbamilfosfato de diamonio y carbamilfosfato de dilitio; y 5'-nucleótidos, tales como 5'-purina ribósida, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-citidílico.
- (3) pH óptimo: 5,2 (reacción de transfosforilación), 6,5 (reacción hidrolítica del éster fosfato).
- (4) Estabilidad del pH: pH 3,0 a 12,0 (tratamiento a 30°C durante 60 minutos).
- (5) Temperatura óptima: 35°C aproximadamente.
- (6) Estabilidad térmica: estable hasta 30°C (tratamiento a pH 7,0 durante 30 minutos).
- (7) Efecto de la adición de un ion metálico e inhibidor: esta enzima no presenta fenómenos de activación relacionados con su actividad, por la adición de algún ion metálico. La actividad es inhibida por Ag^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} y Cu^{2+} . La actividad también es inhibida por el ácido yodoacético.
- (8) Peso molecular: el peso molecular calculado es aproximadamente 190.000, conforme a la cromatografía de líquidos de alta resolución (gel TSK G-3000SW, producido por Toyo Soda).
- (9) Peso molecular de la subunidad: el peso molecular calculado de la subunidad es aproximadamente 25.000, conforme con la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Esta enzima presenta no sólo actividad para transferir el grupos fosfato al nucleósido, sino también actividad para hidrolizar reversiblemente el éster fosfato. Además, esta enzima presenta actividad hidrolítica del éster fosfato (actividad fosfomonoesterasa) que es mayor que la actividad de transfosforilación en no menos de 20 veces. Otras propiedades concuerdan con las de una fosfatasa ácida conocida, producida por una bacteria perteneciente al género *Morganella* [Microbiology, 140, 1341-1350 (1994)]. Consecuentemente, se ha demostrado que esta enzima es una fosfatasa ácida.

Se disolvieron pirofosfato de sodio (10 g/dL) e inosina (2 g/dL) en soluciones tampón de acetato de sodio que tenían cada una de ellas un pH de 5,5, 5,0, 4,5, 4,0 y 3,5, a lo que se añadió la muestra de la enzima descrita anteriormente, de manera que se obtuvo una concentración de 50 unidades/dL. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 6 horas, manteniendo cada pH, y se midió la cantidad de ácido 5'-inosínico producido a lo largo del tiempo. El ácido inosínico producido contenía solamente ácido 5'-inosínico. No se observó en absoluto una producción secundaria de ácido 2'-inosínico ni de ácido 3'-inosínico. El resultado se muestra en la Figura 1. La velocidad de producción del ácido 5'-inosínico fue máxima a pH 5,0. Sin embargo, la cantidad máxima acumulada de ácido 5'-inosínico fue mayor a menor pH. La condición de reacción a pH 4,0 fue más eficaz para la producción de ácido 5'-inosínico, con la que se produjo ácido 5'-inosínico y se acumuló en una cantidad de 2,60 g/dL, realizando la reacción durante 3 horas.

Ejemplo 2

Reacción de fosforilación de varios nucleósidos mediante una muestra de fosfatasa ácida obtenida a partir de Morganella morganii

Se disolvieron pirofosfato de sodio (10 g/dL) e inosina, guanosina, uridina o citidina (2 g/dL), como aceptores del grupos fosfato, en una solución tampón de acetato de sodio (pH 4,0) a la que se añadió la muestra enzimática preparada en el Ejemplo 1, de manera que su concentración era de 50 unidades/dL. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 3 horas manteniendo el pH a 4,0. La cantidad de nucleósido-5'-éster producida por la reacción se muestra en la Tabla 2.

El nucleótido producido contenía sólo nucleósido-5'-éster. No se observó en absoluto una producción secundaria de nucleósido-2'-éster ni de nucleósido-3'-éster.

TABLA 2

Nucleósido	Producto	Cantidad producida (g/dL)
Inosina	Ácido 5'-inosínico	2,60
Guanosina	Ácido 5'-guanílico	1,90
Uridina	Ácido 5'-uridílico	1,30
Citidina	Ácido 5'-citidílico	0,98

Ejemplo 3

Producción de ácido 5'-inosínico a partir de varios compuestos de fosfato como donantes de grupos fosfato mediante la muestra de fosfatasa ácida obtenida a partir de Morganella morganii

Se disolvieron inosina (2 g/dL) y tripolifosfato de sodio, polifosfato de sodio (nombre comercial: Polygon P, producido por Chiyoda Chemical), fenilfosfato de di-sodio o carbamifosfato de disodio (10 g/dL), como donantes de grupos fosfato, en una solución tampón de acetato de sodio (pH 4,0) a la que se añadió la muestra de la enzima preparada en el Ejemplo 1, de manera que su concentración era de 50 unidades/dL. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 3 horas manteniendo el pH a 4,0. La cantidad de ácido 5'-inosínico producido por la reacción se muestra en la Tabla 3.

El ácido 5'-inosínico se produjo y se acumuló eficazmente utilizando cualquiera de los donantes de grupos fosfato. Sin embargo, la cantidad de ácido 5'-inosínico acumulada cuando se usó polifosfato de sodio como donante de grupos fosfato fue la más alta.

TABLA 3

Donante de grupos fosfato	Ácido 5'-inosínico producido (g/dL)
Tripolifosfato de sodio	2,10
Polifosfato de sodio	2,72
Fenilfosfato de disodio	2,33
Carbamifosfato de disodio	2,54

Ejemplo 4

Purificación y caracterización de la fosfatasa ácida obtenida a partir de Escherichia blattae

Un medio nutritivo (pH 7,0, 50 mL) que contenía 1 g/dL de peptona, 0,5 g/dL de extracto de levadura y 1 g/dL de cloruro de sodio se vertió en matraces de Sakaguchi (500 mL) que se habían esterilizado a 120°C durante 20 minutos. Un cultivo inclinado de *Escherichia blattae* JCM1650 se inoculó en cada uno de los matraces, cada vez con un asa de siembre de platino, el cual se cultivó a 30°C durante 16 horas con agitación. Las células microbianas se recogieron del cultivo por centrifugación (3.300 g aproximadamente). Las células microbianas se pusieron en suspensión en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (1 L, pH 7,0). Se realizó un tratamiento con ultrasonidos a 4°C durante 20 minutos para romper las células microbianas. La suspensión tratada se centrifugó para eliminar su fracción insoluble. Se preparó de este modo un extracto exento de células.

Se añadió sulfato de amonio al extracto exento de células de manera que se obtuvo un 30% de saturación. El material precipitado que apareció se eliminó por centrifugación, y luego se añadió adicionalmente sulfato de amonio al material sobrenadante, de manera que se obtuvo un 60% de saturación. El material precipitado que apareció se recogió por centrifugación y se disolvió en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM.

Esta solución enzimática bruta se dializó cuatro veces frente a 5 L de una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y luego se aplicó a una columna de DEAE-Toyopeal 650M (Φ 6,2 x 35 cm) equilibrada con solución tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0), seguido por lavado con una solución tampón de fosfato de potasio 20

mM (pH 7,0). La actividad de transfosforilación se encontró en una fracción que pasó a través de la columna y por lo tanto la fracción se recogió.

Se añadió sulfato de amonio a la fracción activa de manera que se obtuvo 35% de saturación, lo que se aplicó a una columna de Butil-Toyopeal (Φ 5,0 x 22,5 cm) equilibrada con una solución tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0) que contenía sulfato de amonio con 35% de saturación. La elución se realizó utilizando un gradiente de concentración lineal desde 35% de saturación hasta 20% de saturación en una solución tampón de fosfato de potasio (pH 7,0).

Las fracciones activas se recogieron y se dializaron frente a 1 L de solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0), seguido por la aplicación a una columna de hidroxiapatita (Φ 3,0 x 7,0 cm) equilibrada con una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0). La elución se realizó utilizando un gradiente de concentración lineal desde 50 mM hasta 100 mM de solución tampón de fosfato de potasio (pH 7,0) y se recogieron las fracciones activas.

Esta solución enzimática se dializó frente a 1 L de solución tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0), seguido de la aplicación a una columna de CM-Toyopearl (Φ 2,0 x 14,0 cm) equilibrada con una solución tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0). La elución se realizó utilizando un gradiente de concentración lineal en una solución tampón de fosfato de potasio (pH 6,0) que contenía cloruro de potasio desde 0 mM hasta 300 mM. Se recogieron las fracciones activas eluidas de la columna.

Conforme al procedimiento descrito anteriormente, la enzima que presentaba actividad de transfosforilación se purificó a partir del extracto exento de células, en consecuencia aproximadamente 600 veces, con una relación de recuperación de aproximadamente 16%. La actividad específica y la relación de recuperación en este procedimiento de purificación se muestran en la Tabla 4. Esta muestra de enzima fue homogénea en la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

TABLA 4

Etapa	Actividad total (unidad)	Proteína total (mg)	Actividad específica (unidad/mg)	Tasa de recuperación (%)
1. Extracto exento de células	365	160.650	0,002	100
2. Fraccionamiento del sulfato de amonio (30 al 60%)	340	138.895	0,002	93
3. DEAE-Toyopearl	318	30.440	0,010	87
4. Butil-Toyopearl	232	661	0,347	63
5. Hidroxiapatita	96	96	1,000	26
6. CM-Toyopearl	59	43	1,365	16

La enzima purificada presentó las siguientes propiedades:

- (1) Acción: el grupo fosfato se transfiere desde un donante de grupos fosfato tal como ácido polifosfórico al nucleósido y se produce el éster nucleósido-5'-fosfato. Inversamente, esta enzima también presenta actividad para hidrolizar el éster fosfato.
- (2) Especificidad del sustrato: los compuestos que sirven como donantes de grupos fosfato en la reacción de transfosforilación incluyen, por ejemplo, ácido pirofosfórico, ácido tripolifosfórico, ácido trimetafosfórico, ácido tetrametafosfórico, ácido hexametafosfórico, fenilfosfato de disodio, fenilfosfato de dipotasio, carbamilmfosfato de disodio, carbamilmfosfato de dipotasio, carbamilmfosfato de diamonio y carbamilmfosfato de dilitio. Los compuestos que sirven como aceptores de grupos fosfato incluyen, por ejemplo, purina ribósida, inosina, guanosina, adenosina, xantosina, uridina y citidina. Por otra parte, los compuestos que experimentan la acción en la reacción hidrolítica del éster fosfato incluyen, por ejemplo, ácido fosfórico inorgánico, tal como ácido pirofosfórico, ácido tripolifosfórico, ácido trimetafosfórico, ácido tetrametafosfórico, ácido hexametafosfórico; éster fosfato, tal como fenilfosfato de disodio, fenilfosfato de dipotasio, anhídrido del ácido O,O-difenilfosfórico, carbamilmfosfato de disodio, carbamilmfosfato de dipotasio, carbamilmfosfato de diamonio y carbamilmfosfato de dilitio; y 5'-nucleótidos,

ES 2 281 082 T3

tales como 5'-purina ribósida, ácido 5'-inosínico, ácido 5'-guanílico, ácido 5'-adenílico, ácido 5'-xantílico, ácido 5'-uridílico y ácido 5'-citidílico.

- (3) pH óptimo: 5,2 (reacción de transfosforilación), 6,5 (reacción hidrolítica del éster fosfato).
- (4) Estabilidad del pH: pH 3,5 a 12,0 (tratamiento a 30°C durante 60 minutos).
- (5) Temperatura óptima: 35°C aproximadamente.
- (6) Estabilidad térmica: estable hasta 40°C (tratamiento a pH 7,0 durante 30 minutos).
- (7) Efecto de la adición de un ion metálico e inhibidor: Esta enzima no presenta fenómenos de activación relacionados con su actividad por adición de ningún ion metálico. La actividad es inhibida por Fe^{2+} , Ag^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} y Cu^{2+} . La actividad también es inhibida por el ácido yodoacético.
- (8) Peso molecular: el peso molecular calculado es aproximadamente 188.000 conforme a cromatografía de líquidos de alta resolución (gel de TSK G-3000SW, producido por Toyo Soda).
- (9) Peso molecular de la subunidad: el peso molecular calculado de la subunidad es 24.500 conforme con la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Esta enzima presenta no sólo actividad para transferir el grupos fosfato al nucleósido, sino también actividad para hidrolizar reversiblemente el éster fosfato, de la misma forma que la enzima purificada a partir del extracto exento de células de *Morganella morganii* NCIMB 10466. Además, esta enzima presenta actividad hidrolítica del éster fosfato (actividad fosfomonoesterasa) que es mayor que la actividad de transfosforilación en no menos de 30 veces. Consecuentemente, se ha demostrado que esta enzima es una fosfatasa ácida.

Se disolvieron pirofosfato de sodio (15 g/dL) e inosina (3 g/dL) en soluciones tampón de acetato de sodio que tenían cada una de ellas un pH de 5,5, 5,0, 4,5, 4,0 y 3,5, a las que se añadió la muestra de la enzima descrita anteriormente, de manera que se obtuvo una concentración de 50 unidades/dL. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 6 horas, manteniendo cada pH, y se midió la cantidad de ácido 5'-inosínico producido a lo largo del tiempo. El ácido inosínico producido contenía solamente ácido 5'-inosínico. No se observó en absoluto producción secundaria de ácido 2'-inosínico ni de ácido 3'-inosínico. El resultado se muestra en la Figura 2. La velocidad de producción del ácido 5'-inosínico fue máxima a pH 5,0. Sin embargo, la cantidad máxima acumulada de ácido 5'-inosínico fue mayor a menor pH. La condición de reacción a pH 4,0 fue la más eficaz para la producción de ácido 5'-inosínico. El ácido 5'-inosínico se produjo y se acumuló en una cantidad de 1,56 g/dL realizando la reacción a 30°C y pH 4,0 durante 3 horas.

Ejemplo 5

Reacción de fosforilación de varios nucleósidos mediante una muestra de fosfatasa ácida obtenida a partir de Escherichia blattae

Se disolvió pirofosfato de sodio (15 g/dL) e inosina, guanosina, uridina o citidina (3 g/dL) en una solución tampón de acetato de sodio (pH 4,0) a lo que se añadió la muestra de la enzima preparada en el Ejemplo 4, de manera que su concentración fue de 50 unidades/dL. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 3 horas manteniendo el pH a 4,0. La cantidad de nucleósido-5'-éster se muestra en la Tabla 5.

El nucleótido producido contenía sólo nucleósido-5'-éster. No se observó en absoluto producción secundaria de nucleósido-2'-éster ni de nucleósido-3'-éster.

TABLA 5

Nucleósido	Producto	Cantidad producida (g/dL)
Inosina	Ácido 5'-inosínico	1,56
Guanosina	Ácido 5'-guanílico	1,05
Uridina	Ácido 5'-uridílico	1,87
Citidina	Ácido 5'-citidílico	1,22

Ejemplo 6

Producción de ácido 5'-inosínico a partir de varios compuestos de fosfato como donantes de grupos fosfato mediante la muestra de fosfatasa ácida obtenida a partir de Escherichia blattae

Se disolvieron inosina (2 g/dL) y tripolifosfato de sodio, polifosfato de sodio (nombre comercial: Polygon P, producido por Chiyoda Chemical), fenilfosfato de di-sodio o carbamilfosfato de disodio (10 g/dL), como donantes de grupos fosfato, en una solución tampón de acetato de sodio (pH 4,0) a la que se añadió la muestra de la enzima preparada en el Ejemplo 4, de manera que su concentración fuera de 50 unidades/dL. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 3 horas manteniendo el pH a 4,0. La cantidad de ácido 5'-inosínico producido se muestra en la Tabla 6.

El ácido 5'-inosínico se produjo y se acumuló eficazmente utilizando cualquiera de los donantes de grupos fosfato. Sin embargo, la cantidad de ácido 5'-inosínico acumulada cuando se usó polifosfato de sodio como donante de grupos fosfato fue la más elevada.

TABLA 6

Donante de grupos fosfato	Ácido 5'-inosínico producido (g/dL)
Tripolifosfato de sodio	1,20
Polifosfato de sodio	1,79
Fenilfosfato de disodio	1,50
Carbamilfosfato de disodio	1,53

Ejemplo 7

Aislamiento del gen que codifica la fosfatasa ácida a partir del cromosoma de Morganella morganii

1) Determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

La fosfatasa ácida purificada a partir del extracto exento de células de *Morganella morganii* NCIMB 10466, según el método descrito en el Ejemplo 1, se adsorbió a una membrana DITC (producida por Milligen/Biosearch), y su secuencia de aminoácidos N-terminal se determinó utilizando un Prosequencer 6625 (producido por Milligen/Biosearch). Se determinó la secuencia de aminoácidos N-terminal que comprende 20 restos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 1 en la Lista de Secuencias.

2) Aislamiento del fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida

Se extrajo el ADN cromosómico a partir de células microbianas cultivadas de *Morganella morganii* NCIMB 10466, según el método de Murray y Thomson [*Nucl. Acid. Res.*, 4321, 8 (1980)]. El ADN cromosómico se degradó parcialmente con la enzima de restricción *Sau3A1*. A continuación, fragmentos de ADN de 3 a 6 kpb se fraccionaron mediante centrifugación con gradiente de densidad de sacarosa. Se realizó la digestión de un vector plasmídico pUC118 (producido por Takara Shuzo) con la enzima de restricción *Bam*HI, que se ligó con los fragmentos de ADN cromosómico parcialmente degradados. La ligación del ADN se realizó utilizando un equipo de reactivos de ligación de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un método diseñado. A continuación, la *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) se transformó con una mezcla de ADN obtenido según un método convencional. Los transformantes se extendieron en placas sobre un medio de agar L que contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se hicieron crecer para preparar una genoteca.

Una solución de reacción que contenía ácido p-nitrofenilfosfórico 4 mM y una solución tampón de MES/NaOH 100 mM (pH 6,5) se vertió sobre la superficie del medio de agar, sobre el que se habían dejado crecer los transformantes y se mantuvo la temperatura a 30°C durante 15 minutos. Las cepas que habían expresado la actividad fosfatasa liberaron p-nitrofenol y presentaron un color amarillo. Consecuentemente, los transformantes se seleccionaron utilizando este fenómeno como índice. Como resultado del escrutinio de una genoteca de expresión génica que comprendía aproximadamente 20.000 cepas de transformantes, se obtuvieron 30 cepas de transformantes que habían expresado la actividad fosfatasa.

Los transformantes (30 cepas) que habían expresado la actividad fosfatasa se sometieron a aislamiento en colonias aisladas. Las colonias aisladas se inocularon en un medio L (2,5 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas. Se añadió una solución tampón de acetato de sodio (100 mM, pH 5,0, 50 µL) que

contenía inosina (2 g/dL) y pirofosfato de sodio (10 g/dL) a las células microbianas recogidas del cultivo, y la mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 16 horas. La producción de ácido 5'-inosínico se detectó mediante análisis por HPLC para seleccionar las cepas microbianas que tenían actividad de transfosforilación. Como resultado, se lograron obtener 5 cepas de transformantes que presentaban actividad de transfosforilación y que se suponía que hospedaban el fragmento de ADN que contenía el gen deseado de la fosfatasa ácida.

Ejemplo 8

Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de Morganella morganii NCIMB 10466

El fragmento de ADN insertado se analizó preparando un plásmido según un método de lisis alcalina [*Molecular Cloning 2ª Ed.* (J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pág. 25 (1989))] a partir de una cepa de los transformantes que se suponía que hospedaba el fragmento de ADN que contenía el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de *Morganella morganii* NCIMB 10466 obtenida en el Ejemplo 7. Este plásmido se denominó pMPI501. La Figura 3 muestra un mapa con las enzimas de restricción determinadas para el fragmento de ADN insertado.

La región del gen de la fosfatasa ácida se especificó posteriormente por subclonación. Como resultado se sugirió que este gen de la fosfatasa ácida estaba contenido en un fragmento que tenía un tamaño de 1,2 Kbp, escindiendo mediante las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Por lo tanto, con el fin de determinar la secuencia de nucleótidos, se construyó un ADN plasmídico en el que el fragmento de 1,2 kpb se ligó con pUC118 que había sido sometido a digestión con *HindIII* y *EcoRI*. La *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) se transformó con este ADN plasmídico, denominado pMPI505, de acuerdo con un método convencional, ésta se extendió en placas sobre un medio de agar L que contenía 100 µg/mL de ampicilina para obtener un transformante.

El plásmido se extrajo según el método de lisis alcalina a partir del transformante de *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) que hospedaba pMPI505, para determinar la secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se determinó según el método de Sanger [*J. Mol. Biol.*, 143, 161 (1980)] utilizando un equipo de reactivos para secuenciación TaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (producido por Applied Biochemical). Una secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto determinado se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 2 de la Lista de Secuencias. Una secuencia de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 3 de la Lista de Secuencias. Una secuencia parcial, que coincidía totalmente con la secuencia de aminoácidos N-terminal de la enzima purificada, se encontró en la secuencia de aminoácidos. La secuencia N-terminal de la enzima purificada comienza con el resto 21º de alanina de la secuencia mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 3. Consecuentemente, se supone que la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 3 es la de una proteína precursora, y que se elimina un péptido que comprende un segmento desde el resto 1º de metionina al resto 20º de alanina después de la traducción. Una secuencia de aminoácidos de una proteína madura deducida de este modo, se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias. Se calcula que el peso molecular de la proteína madura estimado a partir de la secuencia de aminoácidos, es 24,9 kilodaltons, que concuerda con el resultado del SDS-PAGE para la enzima purificada. Conforme a los resultados descritos anteriormente, y debido al hecho de que el transformante que hospeda el plásmido que contiene este fragmento, presentaba actividad de transfosforilación, se identificó que este marco de lectura abierto era la región que codifica la fosfatasa ácida deseada.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos se compararon por homología, respectivamente con secuencias conocidas. Se utilizaron las bases de datos de EMBL y de SWISS-PROT. Como resultado, se ha demostrado que la secuencia de nucleótidos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 2 de la Lista de Secuencias, coincide con la secuencia de nucleótidos de un gen de la fosfatasa ácida conocido, obtenido a partir de *Morganella morganii* [Thaller, M. C. y col., *Microbiology*, 140, 1341 (1994)], excepto que la G 54º es A, la G 72º es A, la T 276º es G, la T 378º es C, la G 420º es T, la C 525º es G, la C 529º es T y la G 531º es A en el último, y que la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias, es la misma que la del gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de la *Morganella morganii*. A saber, el gen que codifica la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias es el gen de la fosfatasa ácida de la *Morganella morganii* NCIMB 10466.

La proteína precursora comprende 249 aminoácidos y el peso molecular de la proteína deducida a partir de su secuencia es 27,0 kilodaltons.

La cepa de *Escherichia coli* JM109 transformada con un plásmido pMPI505 se ha denominado AJ13143, que ha sido registrada internacionalmente el 23 de Febrero de 1996 en el "National Institute of Bioscience and Human Technology" de la Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, Japón) de acuerdo con lo estipulado por el Tratado de Budapest, y se le ha otorgado el número de registro FERM BP-5422.

Ejemplo 9

Amplificación de la actividad mediante expresión del gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de Morganella morganii NCIMB 10466

Se inoculó *Escherichia coli* JM109/pMPI505 construida en el Ejemplo 8 en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivó a 37°C durante 16 horas. Las células microbianas se recogieron de su cultivo por centrifugación y se lavaron una vez con solución salina fisiológica. Las células microbianas se pusieron en suspensión en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (5 mL, pH 7,2) y se rompieron mediante un tratamiento con ultrasonidos realizado a 4°C durante 20 minutos. La solución tratada se centrifugó para eliminar la fracción insoluble y se preparó de este modo un extracto exento de células.

La actividad de transfosforilación del extracto exento de células obtenido se midió utilizando los testigos de extractos exentos de células preparados a partir de la cepa de tipo silvestre de *Morganella morganii* y de *Escherichia coli* JM109 transformadas con el plásmido pUC118 de la misma manera que la descrita anteriormente. El resultado se muestra en la Tabla 7. No se detectó actividad de transfosforilación en *Escherichia coli* JM109/pUC118. La actividad de transfosforilación fue también baja en la cepa de tipo silvestre de *Morganella morganii*. Por otra parte, *Escherichia coli* JM109/pMPI505 presentó una actividad de transfosforilación elevada, que era 150 veces más alta en actividad específica que la de la cepa de tipo silvestre de *Morganella morganii*. De acuerdo con el resultado, se ha demostrado que el fragmento de ADN introducido permite que *Escherichia coli* exprese la fosfatasa ácida en un nivel elevado.

TABLA 7

Cepa microbiana	Actividad de transfosforilación (unidad/mg)
<u>Morganella morganii</u> NCIMB 10466	0,008
<u>Escherichia coli</u> JM 109/pUC118	no detectada
<u>Escherichia coli</u> JM 109/pMPI505	1,250

Ejemplo 10

Producción del ácido 5'-inosínico a partir de inosina utilizando una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de Morganella morganii NCIM 10466

Se disolvieron pirofosfato de sodio (12 g/dL) e inosina (6 g/dL) en una solución tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,0), a la que se añadieron células microbianas de *Escherichia coli* JM109/pMPI505 descritas anteriormente, para dar una concentración de células de 100 mg/dL expresado en peso seco de las células microbianas. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 6 horas manteniendo el pH a 4,0 y la cantidad de ácido inosínico producido se midió a lo largo del tiempo. El ácido inosínico producido contenía sólo ácido 5'-inosínico. No se observó en absoluto producción secundaria de ácido 2'-inosínico ni de ácido 3'-inosínico. El resultado se muestra en la Figura 4. La cepa que hospedaba el gen de la fosfatasa ácida expresaba una cantidad considerable de fosfatasa ácida y el ácido 5'-inosínico se produjo y se acumuló con eficacia extrema en un corto periodo de tiempo en la reacción, para producir ácido 5'-inosínico a partir de pirofosfato e inosina, empleando este microorganismo. Sin embargo, cuanto se prolongaba el tiempo de reacción, se observó que el ácido 5'-inosínico producido y acumulado había disminuido debido a la degradación.

Ejemplo 11

Preparación de un gen que codifica una fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

Como se ha descrito en los Ejemplos 9 y 10, la cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida, expresa una cantidad considerable de fosfatasa ácida, y el ácido 5'-inosínico se produce y se acumula de forma extremadamente eficaz en un periodo de tiempo corto en la reacción para producir ácido 5'-inosínico, a partir de pirofosfato e inosina utilizando este microorganismo. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico no excede un cierto grado porque el ácido 5'-inosínico experimenta una degradación debido a la actividad fosfomonoesterasa que presenta la propia fosfatasa ácida. Por tanto, se mejoró la enzima introduciendo una mutación en el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de *Morganella morganii* NCIMB 10466, clonado en el Ejemplo 7, según el método de mutagénesis dirigida al sitio, utilizando PCR.

Los oligonucleótidos MUT500, MUT510 y MUT520 mostrados en las secuencias SEQ ID NOs: 5, 6 y 7 en la Lista de Secuencias, se sintetizaron respectivamente según el método de fosfoamidita utilizando un sintetizador de ADN (Modelo 394 producido por Applied Biosystems).

Se añadieron plásmido pMPI505 (1 ng) como molde preparado en el Ejemplo 8, el cebador RV de M13 (producido por Takara Shuzo) y el oligonucleótido MUT510 (2,5 μ moles de cada uno de ellos) como cebadores, y la polimerasa de ADN Taq (2,5 unidades, producida por Takara Shuzo) a una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 8,3, 100 μ L) que contenía dATP, dCTP, dGTP, dTTP (cada uno de ellos 200 μ M), cloruro de potasio (50 mM) y cloruro de magnesio (1,5 mM), para realizar una reacción PCR en la que se repetía 25 veces un ciclo que comprendía periodos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C y 3 minutos a 72°C. La reacción PCR se realizó utilizando un ciclador térmico tipo PJ2000 (producido por Takara Shuzo). Además se realizó una reacción PCR de la misma manera a la descrita anteriormente, utilizando ADN plasmídico de pMPI505 (1 ng) como molde y el cebador M4 de M13 (producido por Takara Shuzo) y el oligonucleótido MUT500 (2,5 μ moles de cada uno) como cebadores. Cada uno de los productos de la reacción se purificó por filtración en gel para eliminar los cebadores empleando una columna Microspin S-400 (producida por Pharmacia).

Cada uno de los productos de la reacción PCR (1 μ L) se añadió a una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 8,3, 95 μ L) que contenía dATP, dCTP, dGTP, dTTP (cada uno 200 μ M), cloruro de potasio (50 mM) y cloruro de magnesio (1,5 mM), y se calentó a 94°C durante 10 minutos, seguido por enfriamiento a 37°C durante 60 minutos. A continuación, la temperatura se mantuvo a 37°C durante 15 minutos para formar un heterodúplex. La polimerasa de ADN Taq (2,5 unidades) se añadió para realizar una reacción a 72°C durante 3 minutos de manera que se completara el heterodúplex. A continuación, se añadieron el cebador RV de M13 y el cebador M4 de M13 (2,5 μ moles de cada uno) a esta solución de reacción para realizar una reacción PCR en la que se repitió 10 veces un ciclo que comprendía periodos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C, y 3 minutos a 72°C.

Se realizó la digestión del producto de la segunda reacción PCR con *Hind*III y *Eco*RI seguido por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Este fragmento de ADN se unió con pUC118 al que se había realizado una digestión con *Hind*III y *Eco*RI. La *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) se transformó como el ADN plasmídico obtenido según un método convencional, se extendió en placas sobre un medio de agar L que contenía 100 μ g/mL de ampicilina para obtener un transformante. El plásmido se extrajo a partir del transformante según el método de lisis alcalina para determinar su secuencia de nucleótidos, confirmando que el nucleótido deseado había sido sustituido. La determinación de la secuencia de nucleótidos se realizó por el método de Sanger [*J. Mol. Biol.* 143, 161 (1980)] utilizando el equipo de reactivos para secuenciación Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (producido por Applied Biochemical). De esta forma, se produjo un gen mutante que codifica una fosfatasa mutante en la que el resto 72° de glicina (GGT) de la proteína madura estaba sustituido por el resto de ácido aspártico (G*AT). El plásmido que contenía este gen mutante se denominó pMPI510.

Además, se preparó un gen mutante que codificaba una fosfatasa mutante en el que el resto 151° de isoleucina (ATC) de la proteína madura se sustituyó con un resto de treonina (A*CC), según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, utilizando pMPI505 como molde, y los oligonucleótidos MUT500 y MUT520 como cebadores. El plásmido que contenía este gen mutante se denominó pMPI520. A continuación, se preparó un gen mutante que codificaba una fosfatasa mutante en la que el resto 72° de glicina (GGT) de la proteína madura se sustituyó por un resto de ácido aspártico (G*AT) y el resto 151° de isoleucina (ATC) de la proteína madura se sustituyó por un resto de treonina (A*CC), según el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando pMPI510 como molde, y los oligonucleótidos MUT500 y MUT520 como cebadores. El plásmido que contenía este gen mutante se denominó pMPI530.

La *Escherichia coli* JM109/pMPI510, la *Escherichia coli* JM109/pMPI520 y la *Escherichia coli* JM109/pMPI530, en las que se habían introducido los plásmidos que contenían los respectivos genes de la fosfatasa ácida mutante, y la *Escherichia coli* JM109/pMPI505, en la que se había introducido el plásmido que contenía el gen de la fosfatasa ácida de tipo silvestre, se inocularon en un medio L (50 mL) que contenía 100 μ g/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas. Las células microbianas se recogieron de su cultivo y se lavaron una vez con solución salina fisiológica. Las células microbianas se pusieron en suspensión en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (5 mL, pH 7,0), y se rompieron mediante un tratamiento con ultrasonidos realizado a 4°C durante 20 minutos. Las soluciones tratadas se centrifugaron para eliminar las fracciones insolubles, y de este modo se prepararon extractos exentos de células. Las actividades fosfomonoesterasa y las actividades de transfosforilación de los extractos exentos de células se midieron a pH 4,0, y se compararon con la actividad de la cepa silvestre.

La Tabla 8 muestra el resultado de la medida de las actividades fosfomonoesterasa y de las actividades de transfosforilación de la fosfatasa ácida de tipo silvestre y de las fosfatasas ácidas mutantes se muestra que tanto las actividades fosfomonoesterasa como las actividades de transfosforilación de las fosfatasas ácidas mutantes, han disminuido en comparación con la fosfatasa ácida de tipo silvestre, y que los grados de disminución de las actividades fosfomonoesterasa son mayores que los de las actividades de transfosforilación, con el resultado de que la relación entre la actividad fosfomonoesterasa y la actividad de transfosforilación de la fosfatasa ácida mutante disminuye en comparación con la fosfatasa ácida de tipo silvestre.

TABLA 8

Plásmido	Actividad fosfomonoesterasa (unidad/mg)	Actividad de transfosforilación (unidad/mg)	Relación ¹⁾ (valor relativo)
PMPI505	5,91	0,625	9,45 (100)
pMPI510	0,59	0,090	6,55 (69)
pMPI520	2,24	0,583	3,84 (40)
pMPI530	1,07	0,318	3,36 (35)

¹⁾ Relación entre las actividades fosfomonoesterasa y las actividades para producir éster nucleósido-5'-fosfato.

Ejemplo 12

Producción de ácido 5'-inosínico a partir de la inosina utilizando las cepas que hospedan un gen que codifica la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

La *Escherichia coli* JM109/pMPI510, *Escherichia coli* JM109/pMPI520 y *Escherichia coli* JM109/pMPI530 en las que se han introducido los plásmidos que contienen los genes que codifican las fosfatasas ácidas mutantes, y la *Escherichia coli* JM109/pMPI505 en la que se ha introducido el plásmido que contiene el gen de la fosfatasa ácida de tipo silvestre, se inocularon en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas.

Se disolvieron pirofosfato de sodio (12 g/dL) e inosina (6 g/dL) en una solución tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,0) a la que se añadieron las células microbianas de cada una de las cepas de *Escherichia coli* obtenidas mediante los cultivos descritos anteriormente, para obtener una concentración celular de 100 mg/dL expresada en peso seco de las células microbianas. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 22 horas manteniendo el pH a 4,0, y la cantidad de ácido 5'-inosínico producido se midió a lo largo del tiempo. El resultado se muestra en la Figura 5.

En la Figura 5, el eje de ordenadas indica la concentración de ácido 5'-inosínico (mg/dL) y el eje de abscisas indica el tiempo de reacción (h). El avance de la reacción, medido utilizando las cepas de las células respectivas, se indica por los círculos negros para la *Escherichia coli* JM109/pMPI505, triángulos negros para la *Escherichia coli* JM109/pMPI510, círculos blancos para la *Escherichia coli* JM109/pMPI520 y cuadrados blancos para la *Escherichia coli* JM109/pMPI530.

La velocidad de degradación del ácido 5'-inosínico producido disminuyó en la reacción para producir ácido 5'-inosínico a partir de inosina utilizando las cepas que hospedan la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida. Como resultado, el rendimiento y la cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico aumentó. La acumulación más alta de ácido 5'-inosínico se obtuvo para la *Escherichia coli* JM109/pMPI530 como cepa que hospeda el gen que codifica la fosfatasa ácida mutante en la que el resto 72° de glicina y el resto 151° de isoleucina se sustituyeron por el resto de ácido aspártico y el resto de treonina, respectivamente.

Ejemplo 13

Producción de varios ésteres nucleósido-5-fosfato utilizando las cepas que hospedan un gen que codifica la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

La *Escherichia coli* JM109/pMPI530 en la que se había introducido el plásmido que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida mutante, se inoculó en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivó a 37°C durante 16 horas.

Se disolvieron pirofosfato de sodio (12 g/dL) e inosina, guanosina, uridina o citidina (6 g/dL) como aceptores de grupos fosfato, en una solución tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,0), a lo que se añadieron las células microbianas descritas anteriormente, para obtener una concentración de células de 100 mg/dL expresada en peso seco de las células. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 22 horas manteniendo el pH a 4,0. Las cantidades de éster nucleósido-5'-fosfato producidas se muestran en la Tabla 9. El nucleótido producido contenía sólo nucleósido-5'-éster fosfato. No se observó en absoluto producción secundaria de éster nucleósido-2'-fosfato ni de éster nucleósido-3'-fosfato.

TABLA 9

Nucleósido	Producto	Cantidad producida (g/dL)
Inosina	Ácido 5'-inosínico	10,01
Guanosina	Ácido 5'-guanílico	6,72
Uridina	Ácido 5'-uridílico	11,90
Citidina	Ácido 5'-citidílico	7,82

Ejemplo 14

Producción de ácido 5'-inosínico a partir de varios compuestos de fosfato como donantes de grupos fosfato utilizando las cepas que hospedan un gen que codifica la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

Se inoculó *Escherichia coli* JM109/pMPI530 en la que se ha introducido el plásmido que contiene el gen de la fosfatasa ácida mutante en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivó a 37°C durante 16 horas.

Se disolvieron inosina (6 g/dL), y tripolifosfato de sodio, polifosfato de sodio (nombre comercial: Polygon P, producido por Chiyoda Chemical), fenilfosfato de di-sodio o carbamilfosfato de disodio (10 g/dL) como donantes de grupos fosfato, en una solución tampón de acetato de sodio (pH 4,5), a lo que se añadieron las células microbianas descritas anteriormente para dar una concentración de 100 mg/dL, expresada en peso seco de las células. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 22 horas manteniendo el pH a 4,0. La cantidad de ácido 5'-inosínico producida se muestra en la Tabla 10. El ácido 5'-inosínico se produjo y se acumuló eficazmente utilizando cualquiera de los donantes de grupos fosfato. Sin embargo, la cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico fue la más elevada cuando se utilizó ácido polifosfórico como donante de grupos fosfato.

TABLA 10

Donante de grupos fosfato	Ácido 5'-inosínico producido (g/dL)
Tripolifosfato de sodio	8,93
Polifosfato de sodio	11,45
Fenilfosfato de disodio	9,62
Carbamilfosfato de disodio	9,89

Ejemplo 15

Aislamiento del gen que codifica la fosfatasa ácida del cromosoma de Escherichia blattae

1) Determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

La fosfatasa ácida purificada a partir del extracto exento de células de *Escherichia blattae* JCM 1650 se adsorbió a una membrana DITC (producida por Milligen/Bioscience), y su secuencia de aminoácidos N-terminal se determinó utilizando un Prosequencer 6625 (producido por Milligen/Bioscience). Se determinó la secuencia de aminoácidos N-terminal que comprende 15 restos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 8 en la Lista de Secuencias.

2) Aislamiento del fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la fosfatasa ácida

Se extrajo el ADN cromosómico de las células cultivadas de *Escherichia blattae* JCM 1650 de acuerdo con el método de Murray y Thomson [*Nucl. Acid. Res.*, 4321, 8 (1980)]. El ADN cromosómico se degradó parcialmente con *Sau3A1*. A continuación, los fragmentos de ADN de 3 a 6 kpb se fraccionaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Se realizó la digestión de un vector plasmídico pUC118 (producido por Takara Shuzo) con *Bam*HI, que se ligó con los fragmentos de ADN cromosómico parcialmente degradados. La ligación del ADN

se realizó utilizando un equipo de reactivos de ligación de ADN (producido por Takara Shuzo) según un método diseñado. A continuación, la *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) se transformó con una mezcla de ADN obtenida según un método convencional. Los transformantes se extendieron en placas sobre un medio de agar L que contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se hicieron crecer para preparar una genoteca.

Una solución de reacción que contenía ácido p-nitrofenilfosfórico 4 mM y una solución tampón de MES/NaOH 100 mM (pH 6,5) se vertió sobre la superficie del medio de agar sobre el que se habían hecho crecer los transformantes, y se mantuvo la temperatura a 30°C durante 15 minutos. Las cepas que habían expresado la actividad fosfatasa liberaron p-nitrofenol y presentaron un color amarillo. Consecuentemente, los transformantes se seleccionaron utilizando este fenómeno como índice. Como resultado del escrutinio de una genoteca de expresión génica de cromosomas que comprendía aproximadamente 8.000 cepas de transformantes, se obtuvieron 14 cepas de transformantes que habían expresado la actividad fosfatasa.

Los transformantes (14 cepas) que habían expresado la actividad fosfatasa se sometieron a aislamiento en colonias aisladas. Las colonias aisladas se inocularon en un medio L (2,5 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas. Se añadió una solución tampón de acetato de sodio (100 mM, pH 5,0, 50 µL) que contenía inosina (2 g/dL) y pirofosfato de sodio (10 g/dL) a las células microbianas recogidas de los líquidos del cultivo, para realizar la reacción a 30°C durante 16 horas. La producción de ácido 5'-inosínico se detectó mediante análisis por HPLC para seleccionar las cepas microbianas que tenían actividad de transfosforilación. Como resultado, se lograron obtener 3 cepas de transformantes que presentaban actividad de transfosforilación y que se suponía que hospedaban el fragmento de ADN que contenía el gen deseado de la fosfatasa ácida.

Ejemplo 16

Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de Escherichia blattae JCM 1650

Se analizó el fragmento de ADN insertado, extrayendo un plásmido de acuerdo con el método de lisis alcalina a partir de una cepa de los transformantes que se suponía que hospedaba el fragmento de ADN que contenía el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de la *Escherichia blattae* JCM 1650, obtenido en el Ejemplo 15. Este plásmido se denominó pEPI301. La Figura 6 muestra un mapa de las enzimas de restricción determinadas del fragmento de ADN insertado.

La región del gen de la fosfatasa ácida se especificó posteriormente por subclonación. Como resultado se sugirió que este gen de la fosfatasa ácida estaba contenido en un fragmento que tenía un tamaño de 2,4 Kbp, escindido con las enzimas de restricción *ClaI* y *BamHI*. Por lo tanto, con el fin de determinar la secuencia de nucleótidos, se construyó un ADN plasmídico en el que el fragmento se ligó con pBluescript KS(+) (producido por Stratagene) que había sido sometido a digestión con *ClaI* y *BamHI*. Se transformó la *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) con el ADN plasmídico denominado pEPI305 según un método convencional, y se extendió en placas sobre un medio de agar L que contenía 100 µg/mL de ampicilina para obtener un transformante.

El plásmido se extrajo según el método de la lisis alcalina a partir del transformante de *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) que hospedaba pEPI305, para determinar la secuencia de nucleótidos. Una secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto determinado se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 9 de la Lista de Secuencias. Una secuencia de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 10 de la Lista de Secuencias. Una secuencia parcial, que coincidía totalmente con la secuencia de aminoácidos N-terminal de la enzima purificada, se encontró en la secuencia de aminoácidos. El extremo N-terminal de la enzima purificada comienza con el resto 19º de leucina de la secuencia mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 10. Consecuentemente, se supone que la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 10 es la de una proteína precursora, y que un péptido que comprende un segmento desde el resto 1º de metionina hasta el resto 18º de alanina se elimina después de la traducción. Una secuencia de aminoácidos de una proteína madura deducida de este modo, se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 11 en la Lista de Secuencias. Consecuentemente, se calcula que el peso molecular estimado de la proteína madura es 25,1 kilodaltons, que concuerda con los resultados del SDS-PAGE para la enzima purificada. De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, y debido al hecho de que el transformante que hospeda el plásmido que contiene este fragmento presentaba actividad de transfosforilación, se identificó que este marco de lectura abierto era la región que codifica la fosfatasa ácida deseada.

A saber, el gen que codifica la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 11 en la Lista de Secuencias es el gen de la fosfatasa ácida de *Escherichia blattae* JCM 1650.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos se compararon por homología respectivamente con secuencias conocidas. Se utilizaron las bases de datos de EMBL y de SWISS-PROT. Como resultado, se ha demostrado que la proteína mostrada en la secuencia SEQ ID NO: 8 y el ADN que la codifica son nuevos. Una proteína precursora codificada por este gen comprende 249 aminoácidos, y el peso molecular de la proteína deducida a partir de su secuencia es 27,0 kilodaltons.

La secuencia de aminoácidos se comparó por homología con secuencias conocidas respectivamente. Como resultado, esta proteína presentaba un alto grado de homología con la fosfatasa ácida de *Providencia stuartii* (77,1%), con

la fosfatasa ácida de *Morganella morganii* del Ejemplo 8 (77,1%) y con la fosfatasa ácida de *Salmonella typhimurium* (44,3%).

La cepa de *Escherichia coli* JM109 transformada con un plásmido pEPI305 se ha denominado AJ13144, la cual ha sido registrada internacionalmente el 23 de Febrero de 1996 en el "National Institute of Bioscience and Human Technology" de la Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibarakiken, Japón) de acuerdo con lo estipulado por el Tratado de Budapest, y se le ha otorgado el número de registro FERM BP-5423.

Ejemplo 17

Amplificación de la actividad por expresión del gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de Escherichia blattae JCM 1650

Se inoculó *Escherichia coli* JM109/pEPI305 construida en el Ejemplo 16 en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivó a 37°C durante 16 horas. Las células microbianas se recogieron de su cultivo por centrifugación y se lavaron una vez con suero fisiológico salino. Las células microbianas se pusieron en suspensión en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (5 mL, pH 7,2) y se rompieron mediante un tratamiento de ultrasonidos realizado a 4°C durante 20 minutos. La solución tratada se centrifugó para eliminar la fracción insoluble y se preparó de este modo un extracto exento de células.

La actividad de transfosforilación del extracto exento de células obtenido, se midió utilizando testigos de extractos exentos de células, preparados a partir de la cepa de tipo silvestre de *Escherichia blattae* y de *Escherichia coli* JM109 transformada con el plásmido pBluescript KS(+) de la misma manera que la descrita anteriormente. El resultado se muestra en la Tabla 11. La actividad de transfosforilación no se detectó en la *Escherichia coli* JM109/pBluescript KS(+). La actividad de transfosforilación fue también baja en la cepa de tipo silvestre de *Escherichia blattae*. Por otra parte, la *Escherichia coli* JM109/pEPI305 exhibió una actividad de transfosforilación elevada que era 120 veces más alta en actividad específica que la cepa de tipo silvestre de *Escherichia blattae*. De acuerdo con el resultado, se ha demostrado que el fragmento de ADN introducido permite que *Escherichia coli* exprese la fosfatasa ácida en un alto nivel.

TABLA 11

Cepa microbiana	Actividad de transfosforilación (unidad/mg)
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	0,002
<i>Escherichia coli</i> JM109/ pBluescript KS(+)	no detectada
<i>Escherichia coli</i> JM109/pEPI305	0,264

Ejemplo 18

Producción de ácido 5'-inosínico a partir de inosina utilizando una cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de la Escherichia blattae JCM 1650

Se disolvieron pirofosfato de sodio (12 g/dL) e inosina (6 g/dL) en una solución tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,0), a la que se añadieron células microbianas de *Escherichia coli* JM109/pEPI305 descritas anteriormente, para dar una concentración de células de 200 mg/dL expresado en peso seco de las células microbianas. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 10 horas manteniendo el pH a 4,0 y la cantidad de ácido inosínico producido se midió a lo largo del tiempo. El ácido inosínico producido contenía sólo ácido 5'-inosínico. No se observó en absoluto producción secundaria de ácido 2'-inosínico ni de ácido 3'-inosínico. El resultado se muestra en la Figura 7. El ácido 5'-inosínico se produjo y se acumuló de forma extremadamente eficaz en un periodo corto de tiempo en la reacción, para producir ácido 5'-inosínico a partir de pirofosfato e inosina utilizando este microorganismo.

Ejemplo 19

Preparación de un gen que codifica una fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

Como se ha descrito en los Ejemplos 17 y 18, la cepa que hospeda el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de *Escherichia blattae*, expresa una cantidad considerable de la fosfatasa ácida, y el ácido 5'-inosínico se produce y se acumula de forma extremadamente eficaz en un periodo de tiempo corto en la reacción, para producir ácido 5'-inosínico a partir de pirofosfato e inosina utilizando este microorganismo. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico no excede un cierto grado porque el ácido 5'-inosínico experimenta una

degradación debido a la actividad fosfomonoesterasa que presenta la propia fosfatasa ácida. Por lo tanto se procuró mejorar la enzima introduciendo una mutación en el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de la *Escherichia blattae* clonada en el Ejemplo 15, según el método de mutagénesis dirigida al sitio, utilizando PCR.

- 5 Los oligonucleótidos MUT300, MUT310 y MUT320 mostrados en las secuencias SEQ ID NO: 12, 13 y 14 en la Lista de Secuencias se sintetizaron respectivamente según el método de la fosfoamidita, utilizando un sintetizador de ADN (Modelo 394 producido por Applied Biosystems).

10 Se añadieron plásmido pEPI305 (1 ng) como molde preparado en el Ejemplo 16, cebador RV de M13 (producido por Takara Shuzo) y el oligonucleótido MUT310 (2,5 μ moles de cada uno de ellos) como cebador, y la polimerasa de ADN Taq (2,5 unidades, producida por Takara Shuzo) a una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 8,3, 100 μ L) que contenía dATP, dCTP, dGTP, dTTP (cada uno de ellos 200 μ M), cloruro de potasio (50 mM) y cloruro de magnesio (1,5 mM), para realizar una reacción de PCR en la que se repetía 25 veces un ciclo que comprendía periodos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C y 3 minutos a 72°C. La reacción de la PCR se realizó utilizando un ciclador térmico tipo PJ2000 (producido por Takara Shuzo). Además se realizó una reacción PCR de la misma manera que la descrita anteriormente, utilizando el plásmido pEPI305 (1 ng) como molde, y como cebador M3 de M13 (producido por Takara Shuzo) y el oligonucleótido MUT300 (2,5 μ moles de cada uno). Cada una de las soluciones de la reacción se purificó por filtración en gel para eliminar los cebadores utilizando una columna Microspin S-400 (producida por Pharmacia).

20 Cada uno de los productos de la reacción PCR (1 μ L) se añadió a una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 8,3, 95 μ L) que contenía dATP, dCTP, dGTP, dTTP (cada uno 200 μ M), cloruro de potasio (50 mM) y cloruro de magnesio (1,5 mM), y se calentó a 94°C durante 10 minutos, seguido por enfriamiento a 37°C durante 60 minutos. A continuación, la temperatura se mantuvo a 37°C durante 15 minutos para formar un heterodúplex. La polimerasa de ADN Taq (2,5 unidades) se añadió para realizar una reacción a 72°C durante 3 minutos de manera que se completara el heterodúplex. A continuación, se añadieron el cebador RV de M13 y el cebador M3 de M13 (2,5 μ moles de cada uno) a esta solución de reacción para realizar una reacción PCR en la que se repitió 10 veces un ciclo que comprendía periodos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C, y 3 minutos a 72°C.

30 Se realizó la digestión del producto de la segunda reacción PCR con *Cla*I y *Bam*HI seguido por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Este fragmento de ADN se ligó con pBluescript KS(+) al que se había realizado una digestión con *Cla*I y *Bam*HI. La *Escherichia coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) se transformó con el ADN plasmídico obtenido según un método convencional, se extendió en placas sobre un medio de agar L que contenía 100 μ g/mL de ampicilina para obtener un transformante.

35 El plásmido se extrajo a partir del transformante según el método de lisis alcalina, para determinar su secuencia de nucleótidos, confirmando que el nucleótido deseado había sido sustituido. Por lo tanto, se preparó un gen mutante que codifica una fosfatasa mutante en la que el resto 74° de glicina (GGG) de la proteína madura se había sustituido con un resto de ácido aspártico (G*A*T). El plásmido que contenía este gen mutante se denominó pEPI310.

40 Se preparó un gen mutante que codifica una fosfatasa mutante en el que el resto 153° de isoleucina (ATC) de la proteína madura se había sustituido con un resto de treonina (A*CC), según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, utilizando pEPI305 como molde, y los oligonucleótidos MUT300 y MUT320 como cebadores. El plásmido que contenía este gen mutante se denominó pEPI320. A continuación, se preparó un gen mutante que codificaba una fosfatasa mutante en la que el resto 74° de glicina (GGG) de la proteína madura se había sustituido por un resto de ácido aspártico (G*A*T) y el resto 153° de isoleucina de la proteína madura se había sustituido por un resto de treonina (A*CC), según el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando pEPI310 como molde, y los oligonucleótidos MUT300 y MUT320 como cebadores. El plásmido que contenía este gen mutante se denominó pEPI330.

50 La *Escherichia coli* JM109/pEPI310, *Escherichia coli* JM109/pEPI320 y *Escherichia coli* JM109/pEPI330, en las que se habían introducido los plásmidos que contenían los respectivos genes de la fosfatasa ácida mutante, y la *Escherichia coli* JM109/pEPI305, en la que se había introducido el plásmido que contenía el gen de la fosfatasa ácida de tipo silvestre, se inocularon en un medio L (50 mL) que contenía 100 μ g/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas. Las células microbianas se recogieron de su cultivo y se lavaron una vez con solución salina fisiológica. Las células microbianas se pusieron en suspensión en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (5 mL, pH 7,0), y se rompieron mediante un tratamiento con ultrasonidos realizado a 4°C durante 20 minutos. Las soluciones tratadas se centrifugaron para eliminar las fracciones insolubles, y de este modo se prepararon extractos exentos de células. La actividad fosfomonoesterasa y la actividad de transfosforilación de los extractos exentos de células se midieron a pH 4,0, y se compararon con la actividad de la cepa silvestre.

65 La Tabla 12 muestra el resultado de la medida de la actividad fosfomonoesterasa y de la actividad de transfosforilación de la fosfatasa ácida de tipo silvestre y de las fosfatasas ácidas mutantes. Se observa que tanto la actividad fosfomonoesterasa como la actividad de transfosforilación de las fosfatasas ácidas mutantes, han disminuido en comparación con la fosfatasa ácida de tipo silvestre, y que los grados de disminución de la actividad fosfomonoesterasa son mayores que los de la actividad de transfosforilación, dando como resultado que la relación entre la actividad fosfomonoesterasa y la actividad de transfosforilación de la fosfatasa ácida mutante disminuye en comparación con la fosfatasa ácida de tipo silvestre.

TABLA 12

Plásmido	Actividad fosfomonoesterasa (unidad/mg)	Actividad de transfosforilación (unidad/mg)	Relación ¹⁾ (valor relativo)
pEPI305	2,38	0,132	18,03 (100)
pEPI310	0,26	0,019	13,68 (76)
pEPI320	0,88	0,123	7,15 (39)
pEPI330	0,42	0,070	6,00 (33)

¹⁾ Relación entre la actividad fosfomonoesterasa y la actividad para producir éster nucleósido-5'-fosfato.

Ejemplo 20

Producción de ácido 5'-inosínico a partir de la inosina utilizando las cepas que hospedan un gen que codifica la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

Escherichia coli JM109/pEPI310, *Escherichia coli* JM109/pEPI320 y *Escherichia coli* JM109/pEPI330 en las que se habían introducido los plásmidos que contienen los genes que codifican las fosfatasas ácidas mutantes y la *Escherichia coli* JM109/pEPI305 en la que se habían introducido el plásmido que contiene el gen de la fosfatasa ácida de tipo silvestre, se inocularon en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas.

Se disolvieron pirofosfato de sodio (12 g/dL) e inosina (6 g/dL) en una solución tampón de acetato de sodio (pH 4,0) a la que se añadieron las células microbianas de cada una de las cepas de *Escherichia coli* obtenidas mediante los cultivos descritos anteriormente, para obtener una concentración de 200 mg/dL expresada en peso seco de las células microbianas. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 32 horas manteniendo el pH a 4,0, y la cantidad de ácido 5'-inosínico producido se midió a lo largo del tiempo. El resultado se muestra en la Figura 8.

En la Figura 8, el eje de ordenadas indica la concentración de ácido 5'-inosínico (mg/dL) y el eje de abscisas indica el tiempo de reacción (h). El avance de la reacción, medido utilizando las cepas de las células respectivas, se indica por los círculos negros para *Escherichia coli* JM109/pEPI305, triángulos negros para *Escherichia coli* JM109/pEPI310, círculos blancos para *Escherichia coli* JM109/pEPI320 y cuadrados blancos para *Escherichia coli* JM109/pEPI330.

La velocidad de degradación del ácido 5'-inosínico producido disminuyó en la reacción para producir ácido 5'-inosínico a partir de inosina utilizando las cepas que hospedan la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida. Como resultado, el rendimiento y la cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico aumentó. La acumulación mayor de ácido 5'-inosínico se obtuvo para *Escherichia coli* JM109/pEPI330 como cepa que hospeda el gen que codifica la fosfatasa ácida mutante en la que el resto 74° de glicina y el resto 153° de isoleucina se sustituyeron por el resto de ácido aspártico y el resto de treonina, respectivamente.

Ejemplo 21

Producción de varios ésteres nucleósido-5'-fosfato utilizando las cepas que hospedan un gen que codifica la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida

Se inoculó *E. coli* JM109/pEPI330 en la que se había introducido el plásmido que contiene el gen de la fosfatasa ácida mutante en un medio L (50 ml) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se incubó a 37°C durante 16 horas.

Se disolvieron pirofosfato sódico (12 g/dL) e inosina, guanina, uridina o citidina (6 g/dL) como aceptor de grupos fosfato en una solución tampón de acetato sódico 100 mM (pH 4,0) y se añadieron las células microbianas descritas anteriormente para proporcionar una concentración celular de 200 mg/dL, expresada en peso seco de las células. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 32 horas manteniendo el pH a 4,0. Las cantidades de éster nucleósido-5'-fosfato formado se muestran en la Tabla 13. El nucleótido formado fue sólo éster nucleósido-5'-fosfato. No se observó en absoluto la formación de éster nucleósido-2'-fosfato ni de éster nucleósido-3'-fosfato como subproductos.

TABLA 13

Nucleósido	Producto	Cantidad producida (g/dL)
Inosina	Ácido 5'-inosínico	7,45
Guanosina	Ácido 5'-guanílico	4,77
Uridina	Ácido 5'-uridílico	8,93
Citidina	Ácido 5'-citidílico	6,60

Ejemplo 22

Producción de ácido 5'-inosínico utilizando las cepas que contienen un gen que codifica la fosfatasa ácida con actividad fosfomonoesterasa disminuida a partir de varios compuestos de fosfato como donantes de grupos fosfato

Se inoculó *E. coli* JM109/pEPI330 en la que se había introducido el plásmido que contiene el gen de la fosfatasa ácida mutante en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivó a 37°C durante 16 horas.

Se disolvieron inosina (6 g/dL) y tripolifosfato sódico, un polifosfato sódico (Polygon P, nombre comercial de un producto de Chiyoda Chemical), fenilfosfato de disodio o carbamilfosfato de disodio (12 g/dL) como donantes de grupos fosfato, en una solución tampón de acetato 100 mM (pH 4,0) a lo que se añadieron las células microbianas descritas anteriormente, para proporcionar una concentración de 200 mg/dL, expresada en peso seco de las células. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 32 horas manteniendo el pH a 4,0. La cantidad de ácido 5'-inosínico formado se muestra en la Tabla 14. El ácido 5'-inosínico se formó y se acumuló con buena eficacia con cualquiera de los donantes de grupos fosfato. Sin embargo, la cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico era mayor cuando el ácido polifosfórico se empleaba como donante de grupos fosfato.

TABLA 14

Donante de grupos fosfato	Ácido 5'-inosínico producido (g/dL)
Tripolifosfato de sodio	5,96
Polifosfato de sodio	8,84
Fenilfosfato de disodio	7,60
Carbamilfosfato de disodio	7,73

Ejemplo 23

*Aislamiento de gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir del cromosoma de *Providencia stuartii* y determinación de la secuencia de nucleótidos del gen*

Se sintetizaron los oligonucleótidos PRP1 y PRP2, que tienen las secuencias de nucleótidos ilustradas en las secuencias SEQ ID NO: 15 y 16 de la Lista de Secuencias, respectivamente. Estos oligonucleótidos se diseñan para amplificar un gen que codifica la fosfatasa ácida de la *Providencia stuartii* en función de la secuencia de nucleótidos conocida del gen que codifica la fosfatasa ácida de la *Providencia stuartii* (base de datos del EMBL, número de inventario X64820).

Se extrajo ADN cromosómico de células microbianas cultivadas de *Providencia stuartii* ATCC 29851 según el método de Murray y Thomson [*Nucl. Acid. Res.* 4321, 8 (1980)]. Se añadió el ADN cromosómico (0,1 ng) como molde, los oligonucleótidos PRP1 y PRP2 (2,5 µmoles de cada uno) como cebadores y la polimerasa de ADN Taq (2,5 unidades, producida por Takara Shuzo) a una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 8,3, 100 µL) que contenía dATP, dCTP, dGTP, dTTP (cada uno de ellos 200 µM), cloruro de potasio (50 mM) y cloruro de magnesio (1,5 mM), para realizar una reacción PCR en la que se repetía 30 veces un ciclo que comprendía periodos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C y 3 minutos a 72°C. La solución de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa, seguida por recuperación del fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1 kpb mediante polvos de vidrio

(fabricados por Takara Shuzo). Se realizó la digestión del fragmento del gen con *Bam*HI, que se ligó con pUC118 y que había sido sometido a digestión con *Bam*HI. El plásmido obtenido tal y como se ha descrito anteriormente, se denominó pPRP100.

- 5 Se midieron la actividad fosfomonoesterasa y la actividad de transfosforilación de *Escherichia coli* JM109/pPRP100, un transformante en el que se había introducido pPRP100. Como resultado, la cepa presentó actividad de transfosforilación del nucleósido, así como actividad fosfomonoesterasa.

10 El plásmido se extrajo según el método de lisis alcalina a partir del transformante de *Escherichia coli* JM109/pPRP100, para determinar la secuencia de nucleótidos. Una secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto determinado y una secuencia de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, se muestran en las secuencias SEQ ID NO: 17 y 18 de la Lista de Secuencias. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto coincide totalmente con la secuencia de nucleótidos del gen conocido de la fosfatasa ácida de *Providencia stuartii*.

15 Ejemplo 24

Aislamiento de los genes de la fosfatasa ácida obtenidos a partir de los cromosomas de *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella planticola* y *Serratia ficaria* y determinación de las secuencias de nucleótidos de los genes

20 Se extrajo ADN cromosómico a partir de las células microbianas cultivadas de *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, *Klebsiella planticola* IFO 14939, y *Serratia ficaria* IAM 13540, según el método de Murray y Thomson [*Nucl. Acid. Res.* 4321, 8 (1980)]. A continuación, según el método descrito en el Ejemplo 7, se construyó una genoteca de expresión de genes cromosómica que comprendía aproximadamente 20.000 transformantes de *Escherichia coli* JM109 y se escrutó para obtener transformantes que mostraran actividad de transfosforilación. Se consideró que cada uno de estos transformantes hospedaba el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de cada una de las cepas originales.

30 El ADN plasmídico se extrajo a partir de uno de los transformantes de *Escherichia coli* que se consideró que tenía el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de la *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, según un método de lisis alcalina y se analizó el ADN insertado del plásmido. El plásmido anterior se denominó pENP100. Un mapa de las enzimas de restricción del ADN insertado obtenido a partir de la *Enterobacter aerogenes* IFO 12010 se muestra en la Figura 9.

35 Como resultado de especificar la región del gen de la fosfatasa ácida mediante subclonación, se sugirió que el gen de la fosfatasa ácida está contenido en el fragmento de 1,6 kpb escindido con las enzimas de restricción *Sal*I y *Kpn*I. A continuación, el fragmento *Sal*I-*Kpn*I se ligó con pUC118 que se había digerido con *Sal*I y *Kpn*I para construir un plásmido. El plásmido resultante se denominó pENP110.

40 Según el procedimiento descrito anteriormente, el ADN plásmido se extrajo de uno de los transformantes de *Escherichia coli* que se consideró que tenía el gen de fosfatasa ácida obtenido a partir de *Klebsiella planticola* IFO 14939, según un método de lisis alcalina y se analizó el ADN insertado del plásmido. El plásmido anterior se denominó pKL100. Un mapa con las enzimas de restricción del ADN insertado obtenido a partir de *Klebsiella planticola* IFO 14939, se muestra en la Figura 10.

45 Como resultado de especificar la región del gen de la fosfatasa ácida mediante subclonación, se sugirió que el gen de la fosfatasa ácida está contenido en el fragmento de 2,2 kpb escindido con las enzimas de restricción *Kpn*I y *Eco*RI. A continuación, el fragmento *Kpn*I-*Eco*RI se ligó con pUC118 que se sometió a digestión con *Kpn*I y *Eco*RI para construir un plásmido. El plásmido resultante se denominó pKLP110.

50 Similarmente, se extrajo el ADN plasmídico de uno de los transformantes de *Escherichia coli* que se consideraba que tenía el gen de la fosfatasa ácida obtenido a partir de *Serratia ficaria* IAM 13540, según un método de lisis alcalina y se analizó el ADN insertado del plásmido. El plásmido anterior se denominó pSEP100. Un mapa con las enzimas de restricción del ADN insertado obtenido a partir de la *Serratia ficaria* IAM 13540, se muestra en la Figura 11.

55 Como resultado de especificar la región del gen de la fosfatasa ácida mediante subclonación, se sugirió que el gen de la fosfatasa ácida está contenido en el fragmento de 1,4 kpb escindido con la enzima de restricción *Hind*III. A continuación, el fragmento *Hind*III se ligó con el pUC118 que se había digerido con *Hind*III para construir un plásmido. El plásmido resultante se denominó pSEP110.

60 A continuación, los ADN plasmídicos se extrajeron a partir de los transformantes *Escherichia coli* JM109/pENP110, *Escherichia coli* JM109/pKLP110 y *Escherichia coli* JM109/pSEP110, en los que se habían introducido pNEP110, pKLP110 y pSEP110, respectivamente, según un método de lisis alcalina. Las secuencias de nucleótidos de los insertos de estos plásmidos se determinaron según el método descrito en el Ejemplo 8. Las secuencias de nucleótidos determinadas de los marcos de lectura abiertos de los insertos se muestran en la secuencia SEQ ID NO: 19 para *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, en la secuencia SEQ ID NO: 21 para *Klebsiella planticola* IFO 14939 y en la secuencia SEQ ID NO: 23 para *Serratia ficaria* IAM 13540. Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos deducidas se muestran en las secuencias SEQ ID NOs: 20, 22 y 24 respectivamente. Debido al hecho de que los transformantes que hospedan los plásmidos que contienen estos fragmentos presentaron actividad de transfosforilación, se identificó que estos marcos de lectura abiertos eran los genes deseados de la fosfatasa ácida.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos deducidas se compararon por homología respectivamente con secuencias conocidas. Se utilizaron las bases de datos EMBL y SWISS-PROT. Como resultado, se ha demostrado que los genes ilustrados en las secuencias SEQ ID NO: 19, 21 y 23 en la Lista de Secuencias, son genes nuevos. Se supuso que la proteína codificada por el gen obtenido a partir de *Enterobacter aerogenes* IFO 12010 comprende 248 restos de aminoácidos, la proteína codificada por el gen obtenido a partir de *Klebsiella planticola* IFO 14939 comprende 248 restos de aminoácidos y que la proteína codificada por el gen obtenido a partir de *Serratia ficaria* IAM 13540 comprende 244 restos de aminoácidos. Hay una posibilidad de que estas proteínas puedan ser proteínas precursoras como las fosfatasa ácidas derivadas de *Morganella morganii* y de *Escherichia blattae*.

Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos se muestran en la Figura 12, con nomenclatura de una letra, junto con la secuencia de aminoácidos deducida de la fosfatasa ácida obtenida a partir de *Morganella morganii* NCIMB 10466 obtenida en el Ejemplo 8, la de *Escherichia blattae* JCM1650 obtenida en el Ejemplo 16 y la secuencia de aminoácidos conocida de la fosfatasa ácida de *Providencia stuartii* (EMBL número de inventario X64820). Los restos de aminoácidos comunes a todas las secuencias de aminoácidos, se indican con asteriscos debajo de las secuencias en la Figura 12.

Como se muestra en la Figura 12, las secuencias de aminoácidos de las fosfatasas ácidas obtenidas a partir de seis cepas son muy homólogas entre sí y 130 restos de aminoácidos son comunes entre todas las secuencias de aminoácidos. Por tanto, se supone que estas fosfatasas ácidas tienen funciones similares.

Ejemplo 25

Amplificación de la actividad mediante expresión del gen que expresa la fosfatasa ácida obtenido a partir de Enterobacter aerogenes, Klebsiella planticola y Serratia ficaria

Se inocularon *Escherichia coli* JM109/pPRP100 construida en el Ejemplo 23, *Escherichia coli* JM109/pENP110, *Escherichia coli* JM109/pKLP110 y *Escherichia coli* JM109/pSEP110 construidas en el Ejemplo 24, en un medio L (50 mL) que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG, y se cultivaron a 37°C durante 16 horas. Las células microbianas se recogieron de estos cultivos por centrifugación, y se lavaron una vez con suero fisiológico salino. Las células microbianas se pusieron en suspensión en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM (5 mL, pH 7,0), y se rompieron mediante un tratamiento por ultrasonidos realizado a 4°C durante 20 minutos. Las soluciones tratadas se centrifugaron para eliminar la fracción insoluble, y de esta forma se prepararon extractos exentos de células.

La actividad de transfosforilación de los extractos exentos de células obtenidos se midió utilizando testigos de extractos exentos de células preparados a partir de *Providencia stuartii* ATCC 29851, *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, *Klebsiella planticola* IFO 14939, *Serratia ficaria* IAM 13540 y *Escherichia coli* JM109, transformadas con el plásmido pUC118 de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 15. La actividad de transfosforilación era baja en todas las cepas de tipo silvestre. La actividad de transfosforilación no se detectó en *Escherichia coli* JM109/pUC118. Por otra parte, los transformantes de *Escherichia coli* JM109 en los que se introdujeron los genes de la fosfatasa ácida, exhibieron actividades de transfosforilación elevadas en comparación con las cepas de tipo silvestre. Según el resultado, se ha demostrado que cada uno de los fragmentos de ADN introducidos permiten que *Escherichia coli* exprese la fosfatasa ácida a un nivel elevado.

TABLA 15

Cepa microbiana	Actividad de transfosforilación (unidad/mg)
<u>Providencia stuartii</u> ATCC 29851	0,005
<u>Enterobacter aerogenes</u> IFO 12010	0,002
<u>Klebsiella planticola</u> IFO 14939	0,002
<u>Serratia ficaria</u> IAM 13540	0,001
<u>Escherichia coli</u> JM109/pUC118	no detectada
<u>Escherichia coli</u> JM109/pPRP100	0,833
<u>Escherichia coli</u> JM109/pENP110	0,301
<u>Escherichia coli</u> JM109/pKLP110	0,253
<u>Escherichia coli</u> JM109/pSEP110	0,123

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, el éster nucleósido-5'-fosfato se puede producir de forma económica y eficaz, permitiendo que la fosfatasa ácida actúe bajo condiciones de pH 3,0 hasta 5,5 sobre un nucleósido y un donante de grupos fosfato seleccionado entre el grupo consistente en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilsfosfato o una de sus sales. Especialmente, el éster nucleósido-5'-fosfato se puede producir más eficazmente empleando la fosfatasa ácida proporcionada por la presente invención, la fosfatasa ácida que tiene la mutación para disminuir la actividad fosfomonoesterasa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para producir éster nucleósido-5'-fosfato que comprende las etapas de permitir que una fosfatasa ácida actúe en condiciones de pH de 3,0 a 5,5 sobre un nucleósido y un donante de grupos fosfato seleccionado entre el grupo consistente en ácido polifosfórico o una de sus sales, ácido fenilfosfórico o una de sus sales y carbamilsfosfato o una de sus sales, para producir éster nucleósido-5'-fosfato y recogerlo.

10 2. El método para producir éster nucleósido-5'-fosfato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fosfatasa ácida tiene una mutación para disminuir su actividad fosfomonoesterasa hasta un nivel menor que el de la fosfatasa ácida de tipo silvestre.

3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha fosfatasa ácida se obtiene a partir de una de las siguientes cepas bacterianas:

15 *Morganella morganii* NCIMB 10466

Morganella morganii IFO 3168

20 *Morganella morganii* IFO 3848

Escherichia blattae JCM 1650

Escherichia blattae ATCC 33429

25 *Escherichia blattae* ATCC 33430

Providencia stuartii ATCC 29851

30 *Providencia stuartii* ATCC 33672

Enterobacter aerogenes IFO 12010

Enterobacter aerogenes IFO 13534

35 *Klebsiella planticola* IFO 14939

Klebsiella planticola IAM 1133

40 *Serratia ficaria* IAM 13540

Serratia marcescens IAM 12143.

45 4. El método para producir éster nucleósido-5'-fosfato según la reivindicación 1, en donde la fosfatasa ácida comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre el grupo consistente en las secuencias ilustradas en las SEQ ID NOs: 4, 11, 18, 20, 22 y 24.

50 5. El método para producir éster nucleósido-5'-fosfato según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde dicha fosfatasa ácida comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre el grupo consistente en las secuencias ilustradas en las SEQ ID NOs: 4, 11, 18, 20 y 24 que tienen una mutación que disminuye la actividad fosfomonoesterasa de dicha fosfatasa ácida hasta un nivel menor que el de la fosfatasa ácida de tipo silvestre.

55 6. El método para producir éster nucleósido-5'-fosfato según la reivindicación 4, en donde dicha mutación se selecciona entre el grupo consistente en sustituciones del resto de aminoácido correspondiente a la(s) sustitución(es) del resto de glicina en la posición 72 y/o el resto de isoleucina en la posición 151, por otro aminoácido en SEQ ID NO: 4.

60 7. El método para producir éster nucleósido-5'-fosfato según la reivindicación 5, en donde dicha mutación se selecciona entre el grupo consistente en la(s) sustitución(es) del resto de glicina en la posición 72 y/o del resto de isoleucina en la posición 151 por otro aminoácido en SEQ ID NO: 4, la(s) sustitución(es) del resto de glicina en la posición 74 y/o del resto de isoleucina en la posición 153 por otro aminoácido en SEQ ID NO: 11, la(s) sustitución(es) del resto de glicina en la posición 92 y/o del resto de isoleucina en la posición 171 por otro aminoácido en SEQ ID NO: 18, 20 o 22, y la(s) sustitución(es) del resto de glicina en la posición 88 y/o del resto de isoleucina en la posición 167 por otro aminoácido en SEQ ID NO: 24.

65

FIG. 1

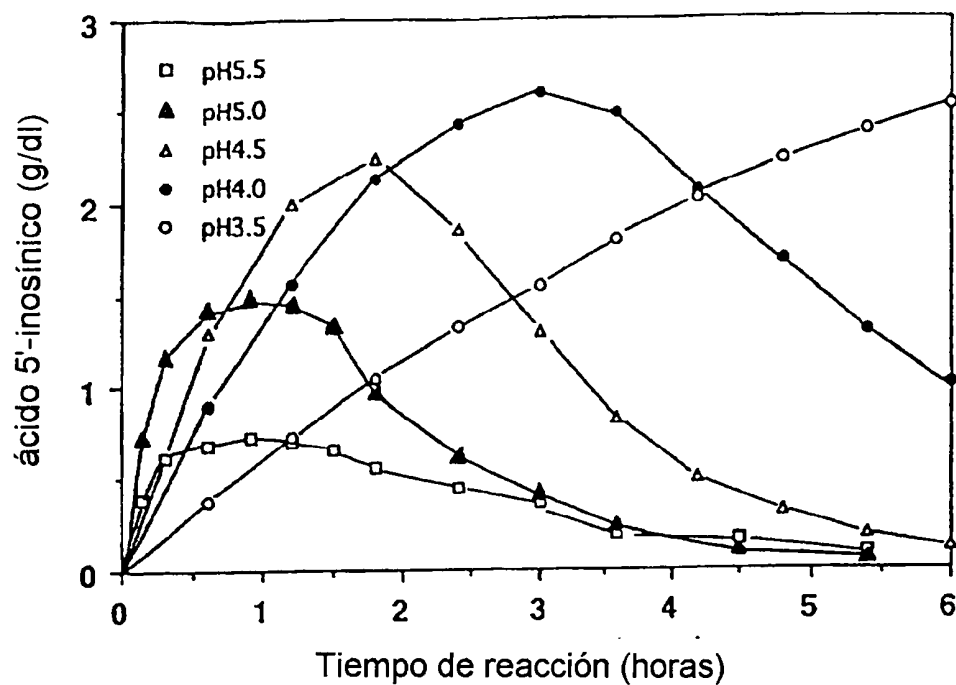
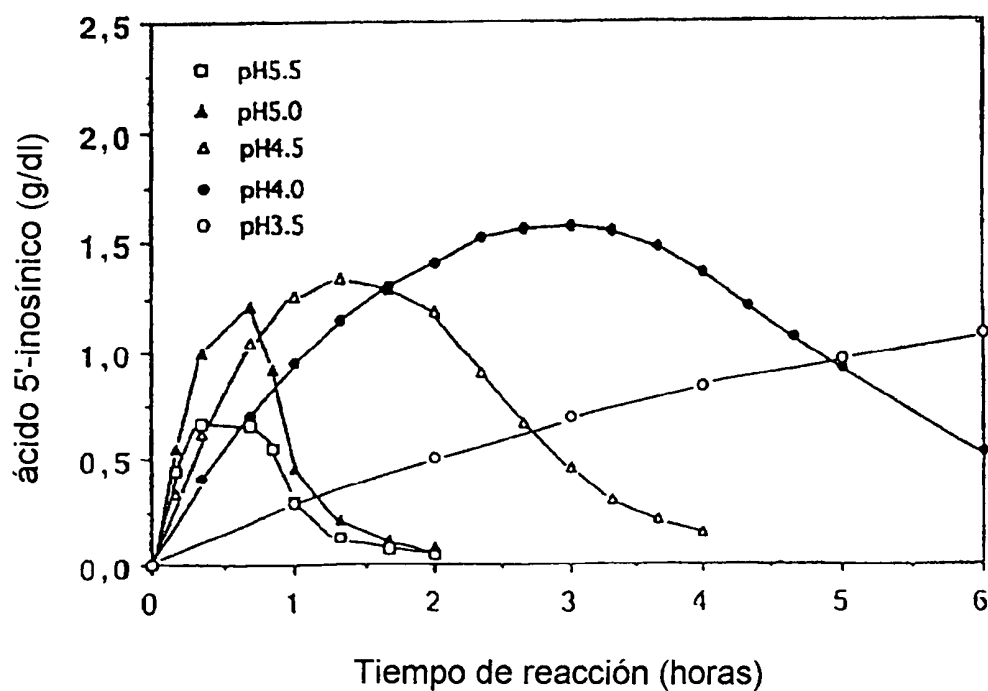
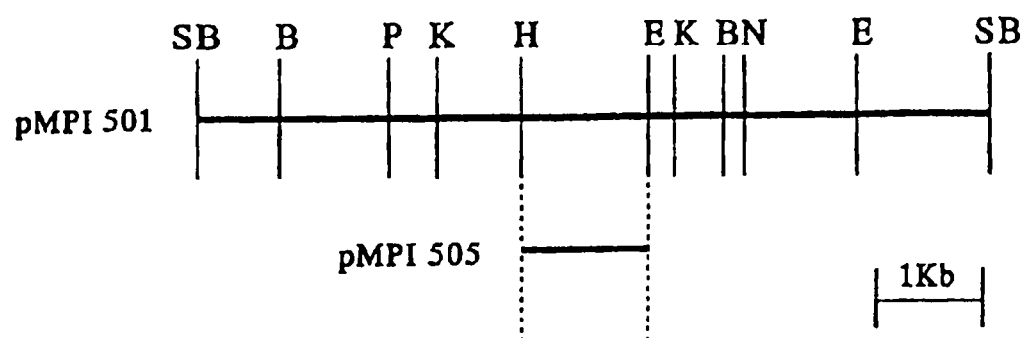


FIG. 2

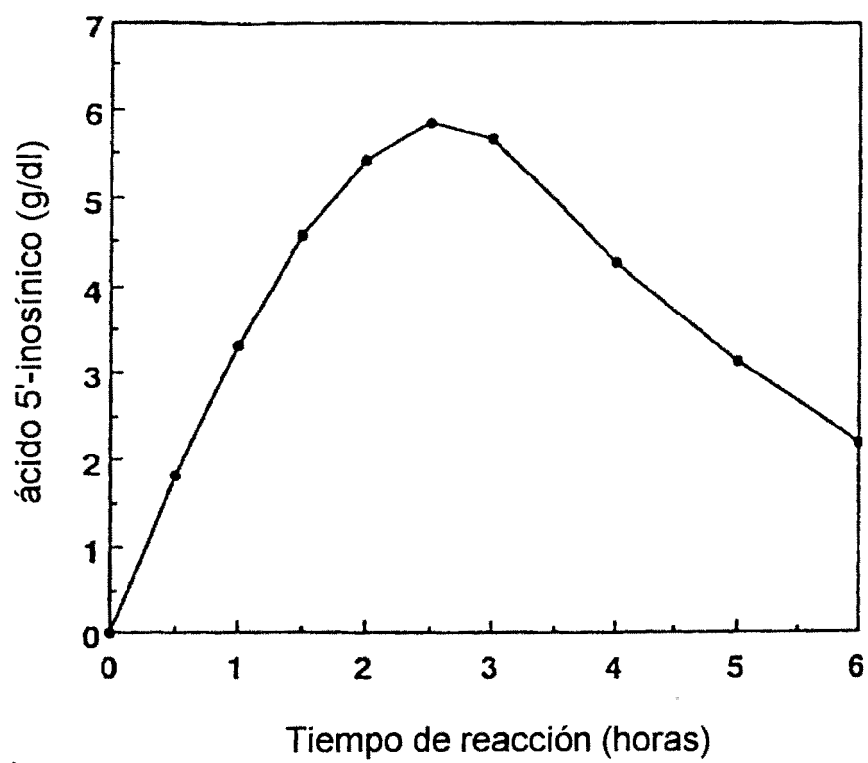


F / G. 3

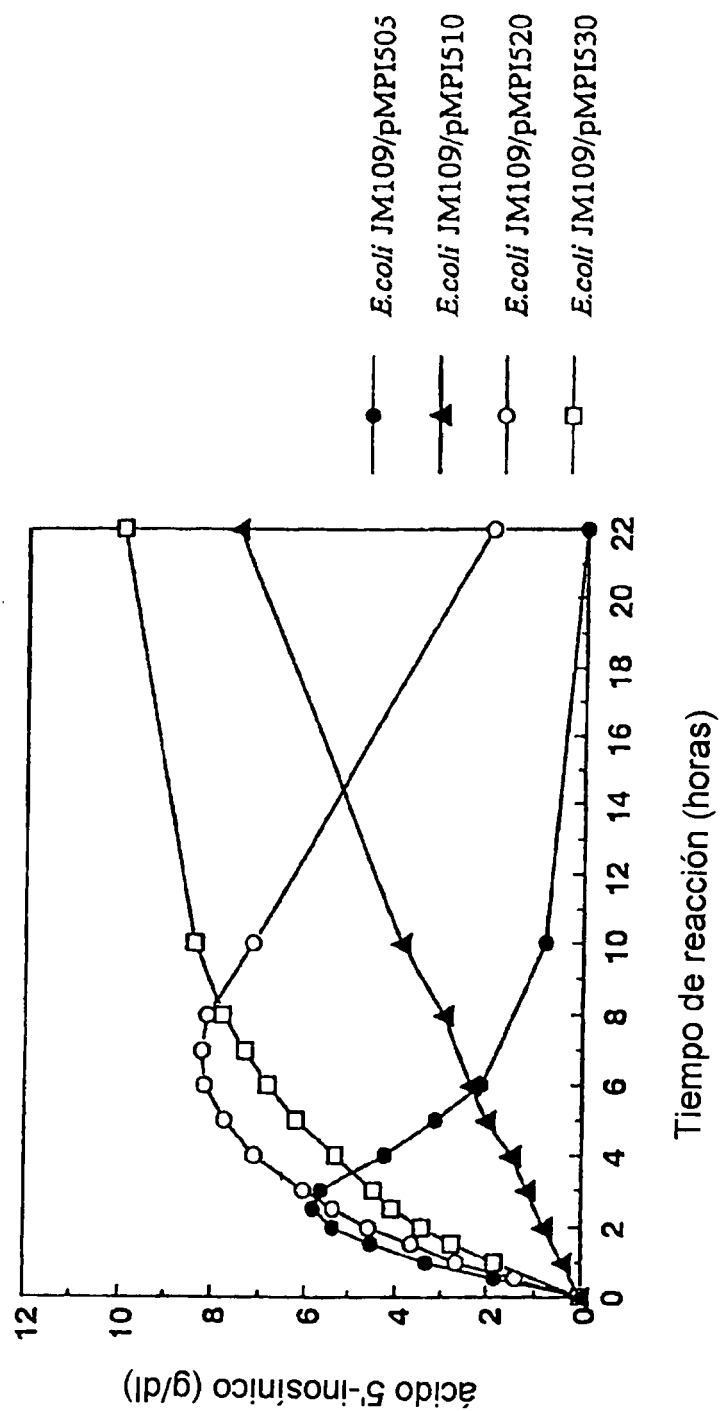


SB: Unión de *Sau*3AI / *Bam*HI B: *Bam* HI E: *Eco*RI K: *Kpn*I
H: *Hind*III N: *Nco*I P: *Pst*I

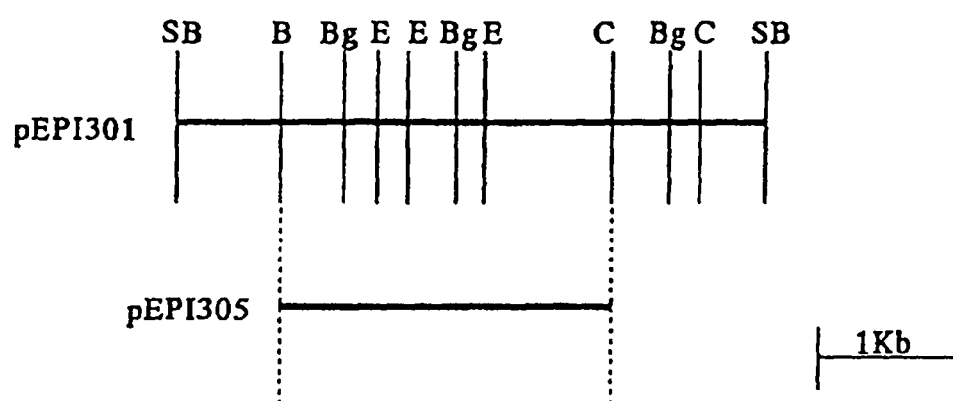
FIG. 4



F I G. 5



F I G. 6



SB: Unión de *Sau3AI* / *Bam*HI B: *Bam*HI Bg: *Bgl*II C: *Cla*I E: *Eco*RI

F I G. 7

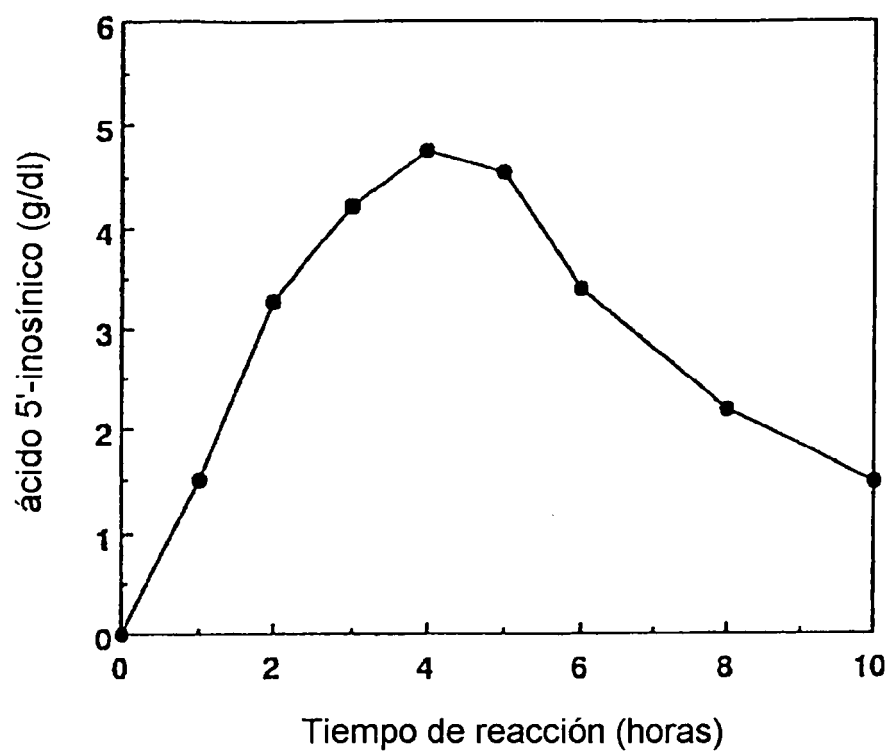
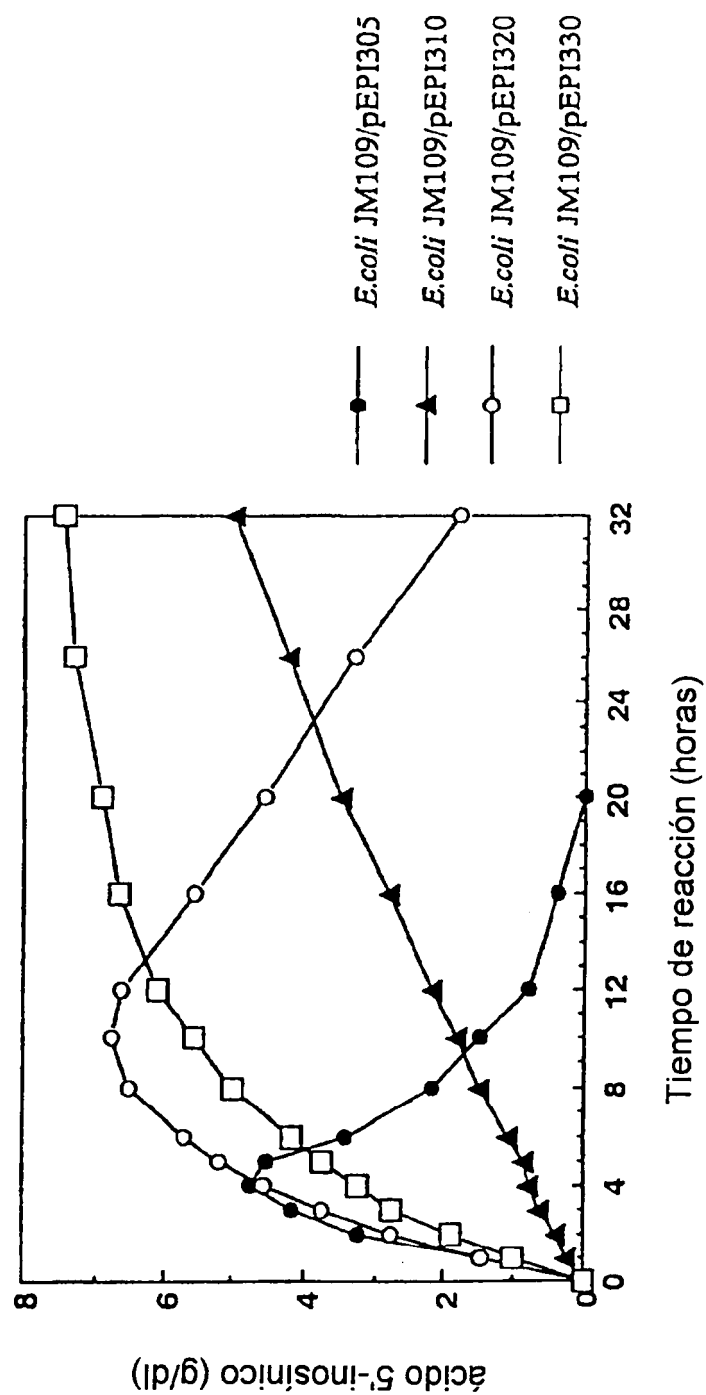
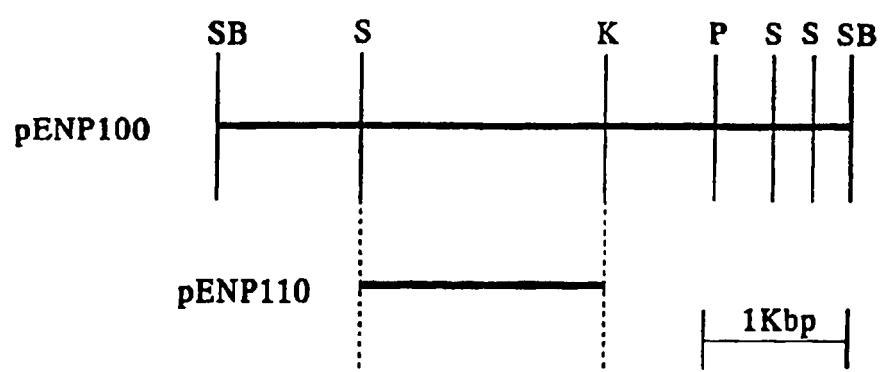


FIG. 8

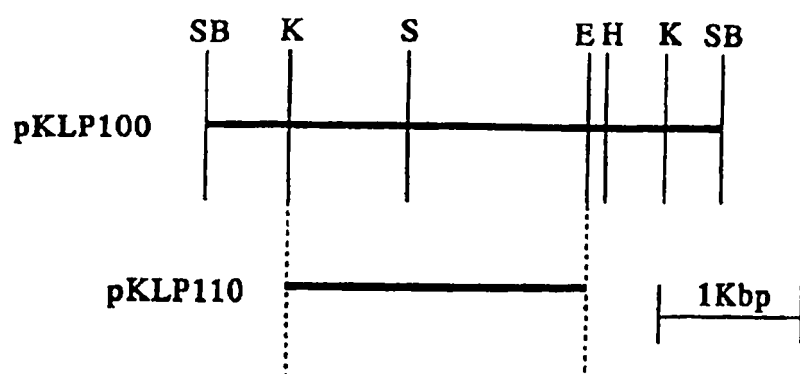


F I G. 9



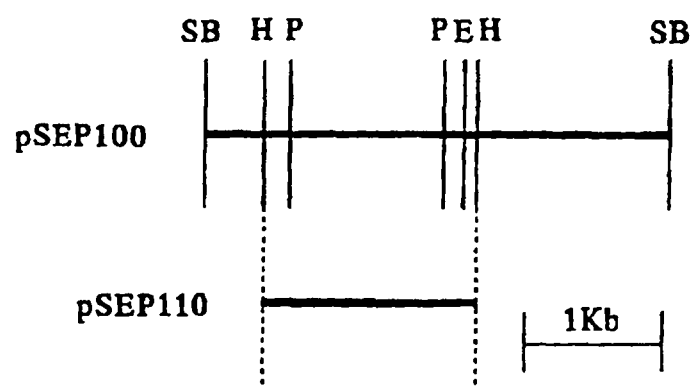
SB: Unión de *Sau3AI* / *BamHI* K: *KpnI* P: *PstI* S: *SalI*

FIG. 10



SB: Unión de *Sau3AI* / *BamHI* E: *EcoRI* H: *HindIII* K: *KpnI*
 S: *SacI*

F I G. 1 1



SB: Unión de *Sau3AI* / *Bam*HI E: *Eco*RI H: *Hind*III P: *Pst*I

FIG. 12

<i>E. aerogenes</i>	1:MKKRVLALCLASLFSYNALVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLP	50
<i>E. blattae</i>	1:MKKRVLAVCFALFSSQALALVATGNDTTTKPDLYYLKNSAIDSLALLP	50
<i>K. planticola</i>	1:MKKRVLALCLASLFSVSALVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLP	50
<i>M. organii</i>	1:MKKNI IAGCLFSLFSLALAAIPAGNDATTKPDLYYLKNEQAIDSLKLLP	50
<i>P. stuartii</i>	1:MKKLLAVFCAGAFVSTSVFAAIPPGNDVTTKPDLYYLKNSQAIDSLALLP	50
<i>S. ficaria</i>	1:MKK-ILLA-TLSCAALTQFS--FAAKDVTTHPEVYFLQESQSIDSLALLP	46
	*** * * * * * * * *	
<i>E. aerogenes</i>	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEKGRLLRNTERGKLAEDANLSAGGVANAFSSA	100
<i>E. blattae</i>	51:PPPAVGSIAFLNDQAMYEQGRLLRNTERGKLAEDANLSSGGVANAFSGA	100
<i>K. planticola</i>	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEKGRLLRATARGKLAEDANLSAGGVANAFSAA	100
<i>M. organii</i>	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEKGRMLRNTERGKQAQADADLAAGGVATAFSGA	100
<i>P. stuartii</i>	51:PPPEVGSILFLNDQAMYEKGRLLRNTERGEQAADADLAAGGVANAFSEA	100
<i>S. ficaria</i>	47:PPPAMDSIDFLNDKAQYDAGKIVRNTPRGKQAYDDAHVAGDGVAAAFSNA	96
	*** * * * * * * * *	
<i>E. aerogenes</i>	101:FGSPITEKDAPQLHKLLTNMIEDAGDLATRSACEKYMIRPFAYGVSTC	150
<i>E. blattae</i>	101:FGSPITEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRSADHYMIRPFAYGVSTC	150
<i>K. planticola</i>	101:FGSPITEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRGACEKYMIRPFAYGVSTC	150
<i>M. organii</i>	101:FGYPITEKDSPELYKLLTNMIEDAGDLATRSACEHYMIRPFAYGTETC	150
<i>P. stuartii</i>	101:FGYPITEKDAPEIHKLLTNMIEDAGDLATRSACEKYMIRPFAYGVATC	150
<i>S. ficaria</i>	97:FGLEIAQRKTPELFKLVKMRDAGDLATRSACKHYMIRPFAYNEATC	146
	** * * * * * * * *	
<i>E. aerogenes</i>	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELGES	200
<i>E. blattae</i>	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELGQS	200
<i>K. planticola</i>	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEINPQRQNEILKRGYELGES	200
<i>M. organii</i>	151:NTKQKKLSTNGSYPSGHTSIGWATALVLAIEVNPANQDAILERGYQLGQS	200
<i>P. stuartii</i>	151:NTKQDKLSKNGSYPSGHTAIGWASALVLEINPENQDKILKRGYELGQS	200
<i>S. ficaria</i>	147:RPDEESTLSKNGSYPSGHTTIGWATALVLAIEINPARQGEILQRGYDMGQS	196
	** * * * * * * * *	
<i>E. blattae</i>	201:RVICGYHWQSDVDAAARVGSVAVATLHTNPAFQQQLQKAKAEFAQHQQK	249
<i>K. planticola</i>	201:RVICGYHWQSDVDAAARIVGSVAVATLHTNPAFQQQLQKAKDEFAKQQK-	248
<i>M. organii</i>	201:RVICGYHWQSDVDAAARIVGSAAVATLHSDPAFQAQLAKAKQEFQKSQK	249
<i>E. aerogenes</i>	201:RVICGYHWQSDVDAAARIVGSVAVATLHTNPAFQQQLQKAKDEFAKTQK-	248
<i>P. stuartii</i>	201:RVICGYHWQSDVDAAARIVASCAVATLHSNPEFQQLQKAKDEFA-KLKK	248
<i>S. ficaria</i>	197:RVICGYHWQSDVTAARMAASAMVARLHAEPFAAQLQKAKDEF-NGLKK	244
	***** * * * * * * * *	

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Ajinomoto Co., Inc.
- (B) CALLE: 15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
- (C) CIUDAD: Tokio
- (D) PAÍS: Japón
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 104 Japón

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Método para producir éster nucleósido-5'-fosfato

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 24

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Edición nº 1.0, Versión nº 1.25 (EPO)

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: EP 96914437.7

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/JP96/01402
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 24-MAY-1996

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: JP 7-149781
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 25-MAY-1995

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: JP 8-094680
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 26-MAR-1996

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Morganella morganii*
- (B) CEPA: NCIMB 10466

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

Ala	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Asp	Leu	Tyr	Tyr
1				5				10					15		

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:2:

ES 2 281 082 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 750 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CATENARIEDAD: doble
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Morganella morganii*
(B) CEPA: NCIMB 10466

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 1..747

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sig_peptide
(B) LOCALIZACIÓN: 1..60

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide
(B) POSICIÓN: 61..747

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEO ID NO:2:

ATG	AAG	AAG	AAT	ATT	ATC	GCC	GGT	TGT	CTG	TTC	TCA	CTG	TTT	TCC	CTT	48
Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ile	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Ser	Leu	Phe	Ser	Leu	
-20					-15				-10					-5		
TCC	GCG	CTG	GCC	GCG	ATC	CCG	GCG	GGC	AAC	GAT	GCC	ACC	ACC	AAG	CCG	96
Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	
			1					5					10			
GAT	TTA	TAT	TAT	CTG	AAA	AAT	GAA	CAG	GCT	ATC	GAC	AGC	CTG	AAA	CTG	144
Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Lys	Leu	
	15						20					25				
TTA	CCG	CCA	CCG	CCG	GAA	GTC	GGC	AGT	ATT	CAG	TTT	TTA	AAT	GAT	CAG	192
Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln	
	30					35					40					

ES 2 281 082 T3

	GCA ATG TAT GAG AAA GGC CGT ATG CTG CGC AAT ACC GAG CGC GGA AAA	240
	Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
5	45 50 55 60	
	CAG GCA CAG GCA GAT GCT GAC CTG GCC GCA GGG GGT GTG GCA ACC GCA	288
	Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala	
	65 70 75	
10	TTT TCA GGG GCA TTC GGC TAT CCG ATA ACC GAA AAA GAC TCT CCG GAG	336
	Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu	
	80 85 90	
15	CTG TAT AAA CTG CTG ACC AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGT GAT CTT GCC	384
	Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
	95 100 105	
20	ACC CGC TCC GCC AAA GAA CAT TAC ATG CGC ATC CGG CCG TTT GCG TTT	432
	Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
	110 115 120	
25	TAC GGC ACA GAA ACC TGT AAT ACC AAA GAT CAG AAA AAA CTC TCC ACC	480
	Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr	
	125 130 135 140	
	AAC GGA TCT TAC CCG TCA GGT CAT ACG TCT ATC GGC TGG GCA ACC GCA	528
	Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala	
30	145 150 155	
	CTG GTG CTG GCG GAA GTG AAC CCG GCA AAT CAG GAT GCG ATT CTG GAA	576
	Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu	
35	160 165 170	
	CGG GGT TAT CAG CTC GGA CAG AGC CGG GTG ATT TGC GGC TAT CAC TGG	624
	Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
	175 180 185	
40	CAG AGT GAT GTG GAT GCC GCG CGG ATT GTC GGT TCA GCC GCT GTC GCG	672
	Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala	
	190 195 200	
45	ACA TTA CAT TCC GAT CCG GCA TTT CAG GCG CAG TTA GCG AAA GCC AAA	720
	Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys	
	205 210 215 220	
	CAG GAA TTT GCA CAA AAA TCA CAG AAA TAA	750
50	Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys	
	225 229	

55 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 249 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

65 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Morganella morganii*

(B) CEPA: NCIMB 10466

ES 2 281 082 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

5 Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu
 -20 -15 -10 -5
 Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 1 5 10
 10 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu
 15 20 25
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln
 30 35 40
 15 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 45 50 55 60
 Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala
 65 70 75
 20 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu
 80 85 90
 Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 95 100 105
 25 Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 110 115 120
 Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr
 125 130 135 140
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 145 150 155
 35 Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu
 160 165 170
 Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 175 180 185
 40 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala
 190 195 200
 Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys
 205 210 215 220
 Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys
 225 229
 50

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 229 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 60 (A) ORGANISMO: *Morganella morganii*
 65 (B) CEPA: NCIMB 10466

ES 2 281 082 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

	Ala	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Asp	Leu	Tyr	Tyr
	1				5						10				15	
5	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro
				20					25					30		
	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln	Ala	Met	Tyr	Glu
10			35					40					45			
	Lys	Gly	Arg	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Glu	Arg	Gly	Lys	Gln	Ala	Gln	Ala
	50					55						60				
15	Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Phe	Ser	Gly	Ala
	65					70				75					80	
	Phe	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Pro	Glu	Leu	Tyr	Lys	Leu
					85					90				95		
20	Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	Ser	Ala
				100						105				110		
	Lys	Glu	His	Tyr	Met	Arg	Ile	Arg	Pro	Phe	Ala	Phe	Tyr	Gly	Thr	Glu
	115						120						125			
25	Thr	Cys	Asn	Thr	Lys	Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Ser	Thr	Asn	Gly	Ser	Tyr
	130					135						140				
	Pro	Ser	Gly	His	Thr	Ser	Ile	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Ala
30	145					150				155					160	
	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Gln	Asp	Ala	Ile	Leu	Glu	Arg	Gly	Tyr	Gln
					165					170				175		
35	Leu	Gly	Gln	Ser	Arg	Val	Ile	Cys	Gly	Tyr	His	Trp	Gln	Ser	Asp	Val
				180					185					190		
	Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Leu	His	Ser
	195						200					205				
40	Asp	Pro	Ala	Phe	Gln	Ala	Gln	Leu	Ala	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe	Ala
	210					215						220				
	Gln	Lys	Ser	Gln	Lys											
45	225				229											

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:5:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CATENARIEDAD: sencilla
 - 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
 - (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "synthetic DNA"
- 60 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

ATTACCATGA TTACGAATTC

ES 2 281 082 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

GCGGTTGCCA CATCCCCTGC G

21

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

TTGCCAGCC GGTAGACGTA T

21

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Escherichia blattae*

(B) CEPA: JCM 1650

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:9:

ES 2 281 082 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 750 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Escherichia blattae*
- (B) CEPA: JCM 1650

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..747

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: sig_peptide
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..54

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide
- (B) POSICIÓN: 55..747

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

35	ATG AAA AAA CGT GTT CTG GCA GTT TGT TTT GCC GCA TTG TTC TCT TCT 48 Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Val Cys Phe Ala Ala Leu Phe Ser Ser -18 -15 -10 -5	
40	CAG GCC CTG GCG CTG GTC GCT ACC GGC AAC GAC ACT ACC ACG AAA CCG 96 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro 1 5 10	
45	GAT CTC TAC TAC CTC AAG AAC AGT GAA GCC ATT AAC AGC CTG GCG CTG 144 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu 15 20 25 30	
50	TTG CCG CCA CCA CCG GCG GTG GGC TCC ATT GCG TTT CTC AAC GAT CAG 192 Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln 35 40 45	
55	GCC ATG TAT GAA CAG GGG CGC CTG CTG CGC AAC ACC GAA CGC GGT AAG 240 Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys 50 55 60	
60	CTG GCG GCG GAA GAT GCA AAC CTG AGC AGT GGC GGG GTG GCG AAT GCT 288 Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala 65 70 75	
65	TTC TCC GGC GCG TTT GGT AGC CCG ATC ACC GAA AAA GAC GCC CCG GCG 336 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala 80 85 90	

ES 2 281 082 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

(2) INFORMACIÓN DE LA SEO ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45

50

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

60

ES 2 281 082 T3

```

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

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:11:

```

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
    (A) LONGITUD: 231 aminoácidos
    (B) TIPO: aminoácido
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal
    (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
    (vi) FUENTE ORIGINAL:
50 (A) ORGANISMO: Escherichia blattae
    (B) CEPA: JCM 1650
    (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:
55
    Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu
      1              5              10              15
    Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu Leu Pro
60      20              25              30
    Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met
      35              40              45
65 Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Leu Ala
      50              55              60

```

ES 2 281 082 T3

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:12:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 40 (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = “synthetic DNA”
- 45 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEO ID NO:12:

CCTCGAGGTC GACGGTATCG

20

55 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:13:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = “synthetic DNA”
- (iii) HIPOTÉTICO: NO

ES 2 281 082 T3

(iv) ANTI-SENTIDOCO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

5 ATTCGCCACA TCGCCACTGC T 21

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:14:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 22 pares de bases

 (B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CATENARIEDAD: sencilla

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

20 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "synthetic DNA"

 (iii) HIPOTÉTICO: NO

 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

 TAGCCCAGCC GGTAGAGGTA TG 22

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:15:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 25 pares de bases

35 (B) TIPO: ácido nucleico

 (C) CATENARIEDAD: sencilla

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

40 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "synthetic DNA"

 (iii) HIPOTÉTICO: NO

 (iv) ANTI-SENTIDO: SI

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

 CTGGATCCTG TGGCCTATCAT CACCT 25

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:16:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 25 pares de bases

55 (B) TIPO: ácido nucleico

 (C) CATENARIEDAD: sencilla

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "synthetic DNA"

 (iii) HIPOTÉTICO: NO

65 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

CTGGATCCGA CGCGATTTTA CCATA

25

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:17:

5	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 747 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
10	(C) CATENARIEDAD: doble	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
15	(iii) HIPOTÉTICO: NO	
	(iv) ANTI-SENTIDO: NO	
	(vi) FUENTE ORIGINAL:	
20	(A) ORGANISMO: <i>Providencia stuartii</i>	
	(B) CEPA: ATCC 29851	
	(ix) CARACTERÍSTICAS:	
25	(A) NOMBRE/CLAVE: CDS	
	(B) POSICIÓN: 1..744	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N:17:	
30	ATG AAA AAA CTA TTA GCA GTA TTC TGC GCA GGG GCT TTT GTT TCA ACC	48
	Met Lys Lys Leu Leu Ala Val Phe Cys Ala Gly Ala Phe Val Ser Thr	
	1 5 10 15	
35	AGT GTA TTT GCG GCG ATC CCT CCC GGC AAT GAT GTG ACA ACT AAA CCC	96
	Ser Val Phe Ala Ala Ile Pro Pro Gly Asn Asp Val Thr Thr Lys Pro	
	20 25 30	
40	GAT CTT TAT TAT TTA AAA AAC TCA CAG GCT ATT GAT AGT TTA GCG TTA	144
	Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
	35 40 45	
45	TTG CCG CCA CCA CCT GAA GTG GGC AGT ATC TTA TTT TTA AAC GAC CAA	192
	Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Leu Phe Leu Asn Asp Gln	
	50 55 60	
50	GCG ATG TAT GAA AAA GGC CGT TTA TTG CGA AAT ACT GAG CGT GGA GAA	240
	Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Glu	
	65 70 75 80	
55	CAA GCC GCT AAG GAT GCT GAT CTG GCT GCG GGC GGT GTT GCG AAC GCA	288
	Gln Ala Ala Lys Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
	85 90 95	
60	TTT TCT GAA GCT TTT GGT TAT CCC ATT ACC GAA AAG GAT GCG CCT GAA	336
	Phe Ser Glu Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Glu	
	100 105 110	
65	ATT CAT AAA TTG CTG ACG AAT ATG ATT GAA GAT GCG GGG GAT TTA GCA	384
	Ile His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
	115 120 125	
70	ACT CGC TCA GCC AAA GAG AAA TAC ATG CGC ATT CGT CCA TTT GCG TTC	432
	Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
	130 135 140	

ES 2 281 082 T3

	TAC GGT GTT GCT ACC TGT AAC ACG AAA GAT CAG GAC AAA TTA TCT AAG	480
	Tyr Gly Val Ala Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys	
5	145 150 155 160	
	AAT GGC TCT TAT CCT TCT GGA CAC ACC GCA ATT GGC TGG GCA TCT GCA	528
	Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala Ile Gly Trp Ala Ser Ala	
	165 170 175	
10	CTC GTA TTG TCA GAA ATT AAC CCA GAA AAC CAA GAT AAA ATT TTA AAA	576
	Leu Val Leu Ser Glu Ile Asn Pro Glu Asn Gln Asp Lys Ile Leu Lys	
	180 185 190	
15	CGT GGT TAT GAA CTT GGC CAA AGC CGA GTC ATC TGT GGT TAC CAT TGG	624
	Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
	195 200 205	
20	CAA AGT GAT GTT GAT GCA GCT CGT ATC GTT GCA TCG GGT GCG GTA GCA	672
	Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Ala Ser Gly Ala Val Ala	
	210 215 220	
25	ACT TTA CAC TCC AAC CCT GAA TTC CAA AAA CAG TTA CAA AAA GCC AAA	720
	Thr Leu His Ser Asn Pro Glu Phe Gln Lys Gln Leu Gln Lys Ala Lys	
	225 230 235 240	
	GAC GAA TTT GCT AAA CTG AAA AAA TAG	747
	Asp Glu Phe Ala Lys Leu Lys Lys	
30	245	

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:18:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 248 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Providencia stuartii*

(B) CEPA: ATCC 29851

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

50	Met	Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Cys	Ala	Gly	Ala	Phe	Val	Ser	Thr
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Phe	Ala	Ala	Ile	Pro	Pro	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Thr	Lys	Pro
55				20					25					30		
	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu
			35					40					45			
60	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln
		50					55					60				
	Ala	Met	Tyr	Glu	Lys	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Asn	Thr	Glu	Arg	Gly	Glu
	65					70					75				80	
65	Gln	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Asn	Ala
					85					90					95	

ES 2 281 082 T3

Phe Ser Glu Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Glu
 100 105 110
 5 Ile His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 115 120 125
 Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 10 Tyr Gly Val Ala Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala Ile Gly Trp Ala Ser Ala
 15 165 170 175
 Leu Val Leu Ser Glu Ile Asn Pro Glu Asn Gln Asp Lys Ile Leu Lys
 180 185 190
 20 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 195 200 205
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Ala Ser Gly Ala Val Ala
 210 215 220
 25 Thr Leu His Ser Asn Pro Glu Phe Gln Lys Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 Asp Glu Phe Ala Lys Leu Lys Lys
 245
 30

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:19:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 744 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CATENARIEDAD: doble
 40 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 45 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Enterobacter aerogenes*
 50 (B) CEPA: IFO 12010
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 55 (B) LOCALIZACIÓN: 1..744
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

60 ATG AAA AAG CGC GTT CTC GCC CTC TGC CTC GCC AGC CTG TTT TCC GTT 48
 Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
 1 5 10 15
 AAC GCT TTC GCG CTG GTC CCT GCC GGC AAT GAT GCA ACC ACC AAA CCG 96
 65 Asn Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 20 25 30

ES 2 281 082 T3

	GAT CTC TAT TAT CTG AAA AAT GCA CAG GCC ATC GAT AGT CTG GCG CTG	144
	Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
5	35 40 45	
	TTG CCG CCG CCG CCG GAA GTT GGC AGC ATC GCA TTT TTA AAC GAT CAG	192
	Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln	
	50 55 60	
10	GCG ATG TAT GAG AAA GGA CGG CTG TTG CGC AAT ACC GAA CGT GGC AAG	240
	Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys	
	65 70 75 80	
15	CTG GCG GCT GAA GAT GCT AAC CTG AGC GCC GGC GGC GTC GCG AAT GCC	288
	Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
	85 90 95	
20	TTC TCC AGC GCT TTT GGT TCG CCC ATC ACC GAA AAA GAC GCG CCG CAG	336
	Phe Ser Ser Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Gln	
	100 105 110	
25	TTA CAT AAG CTG CTG ACA AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGC GAT CTG GCC	384
	Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
	115 120 125	
	ACC CGC AGC GCG AAA GAG AAA TAT ATG CGC ATT CGC CCG TTT CCG TTC	432
30	Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
	130 135 140	
	TAC GGC GTT TCA ACC TGT AAC ACT ACC GAG CAG GAC AAG CTG TCG AAA	480
	Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys	
35	145 150 155 160	
	AAC GGA TCT TAC CCT TCC GGC CAT ACC TCT ATC GGT TGG GCA ACC GCG	528
	Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala	
	165 170 175	
40	CTG GTA CTG GCG GAG ATC AAT CCG CAG CGG CAA AAC GAA ATT CTC AAA	576
	Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys	
	180 185 190	
45	CGC GGC TAT GAA TTG GGC GAA AGC CGG GTT ATC TGC GGC TAT CAT TGG	624
	Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp	
	195 200 205	
50	CAG AGC GAT GTC GAT GCG GCG CGG ATA GTC GGC TCG GCG GTG GTG GCG	672
	Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala	
	210 215 220	
55	ACC CTG CAT ACC AAC CCG GCC TTC CAA CAG CAG TTG CAG AAA GCA AAG	720
	Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys	
	225 230 235 240	
	GAT GAA TTC GCC AAA ACG CAG AAG TAA	747
60	Asp Glu Phe Ala Lys Thr Gln Lys	
	245	

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:20:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 248 aminoácidos

ES 2 281 082 T3

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Enterobacter aerogenes*

(B) CEPA: IFO 12010

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

```

Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
 1           5           10           15
Asn Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
          20           25           30
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu
          35           40           45
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
          50           55           60
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
          65           70           75           80
Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
          85           90           95
Phe Ser Ser Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Gln
          100          105          110
Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
          115          120          125
Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
          130          135          140
Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
          145          150          155          160
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
          165          170          175
Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
          180          185          190
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
          195          200          205
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala
          210          215          220
Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
          225          230          235          240
Asp Glu Phe Ala Lys Thr Gln Lys
          245

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 747 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: doble

ES 2 281 082 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Klebsiella planticola*

(B) CEPA: IFO 14939

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..747

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

20	ATG AAA AAG CGT GTA CTC GCC CTT TGC CTT GCC AGC CTC TTT TCA GTT	48
	Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val	
	1 5 10 15	
25	AGC GCC TTT GCG CTG GTT CCC GCC GGC AAT GAT GCC ACC ACC AAG CCC	96
	Ser Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
	20 25 30	
30	GAT CTC TAC TAT CTG AAA AAT GCC CAG GCC ATT GAC AGC CTG GCG CTG	144
	Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
	35 40 45	
	TTG CCA CCG CCG CCG GAA GTG GGC AGC ATT GCG TTT TTA AAC GAT CAG	192
35	Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln	
	50 55 60	
	GCG ATG TAT GAG AAA GGC CGT CTG CTG CGC GCC ACC GCC CGC GGC AAG	240
40	Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Ala Thr Ala Arg Gly Lys	
	65 70 75 80	
	TTG GCG GCA GAA GAT GCC AAC CTG AGC GCG GGT GGC GTG GCC AAC GCC	288
	Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
45	85 90 95	
	TTC TCC GCA GCA TTC GGC TCC CCG ATC AGC GAA AAA GAC GCC CCG GCG	336
	Phe Ser Ala Ala Phe Gly Ser Pro Ile Ser Glu Lys Asp Ala Pro Ala	
	100 105 110	
50	CTG CAC AAA CTG CTC ACC AAC ATG ATT GAA GAC GCG GGC GAT CTG GCG	384
	Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
	115 120 125	
55	ACC CGA GGC GCG AAA GAG AAG TAT ATG CGT ATT CGT CCG TTT GCC TTC	432
	Thr Arg Gly Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
	130 135 140	

ES 2 281 082 T3

```

TAC GGC GTG TCC ACC TGC AAT ACC ACC GAA CAG GAT AAG CTG TCG AAA      480
Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
145                      150                      155                      160
5  AAC GGC TCC TAC CCT TCC GGA CAC ACC TCT ATC GGC TGG GCG ACC GCC      528
   Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
                        165                      170                      175
10  CTG GTG CTG GCC GAA ATC AAC CCG CAG CGC CAG AAT GAG ATT CTC AAG      576
   Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
                        180                      185                      190
15  CGC GGC TAT GAG CTC GGT GAA AGT CGG GTG ATC TGC GGT TAC CAC TGG      624
   Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
                        195                      200                      205
20  CAG AGC GAT GTT GAC GCC GCG CGG ATT GTC GGC TCG GCG GTG GTT GCA      672
   Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala
                        210                      215                      220
25  ACC CTG CAT ACC AAT CCG GCC TTC CAG CAG CAG CTG CAA AAA GCC AAA      720
   Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
225                      230                      235                      240
   GAC GAG TTT GCG AAA CAG CAG AAA TAG      747
   Asp Glu Phe Ala Lys Gln Gln Lys
30                      245

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:22:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 248 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 40 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - 45 (A) ORGANISMO: *Klebsiella planticola*
 - (B) CEPa: IFO 14939
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

```

50  Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
    1                      5                      10                      15
    Ser Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
55                      20                      25                      30
    Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu
    35                      40                      45
60  Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
    50                      55                      60
    Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Ala Thr Ala Arg Gly Lys
    65                      70                      75                      80
65  Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
    85                      90                      95

```

ES 2 281 082 T3

[illegible]

(2) INFORMACIÓN DE LA SEO ID NO:23:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 735 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 40 (C) CATENARIEDAD: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 45 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 50 (A) ORGANISMO: *Serratia ficaria*
- (B) CEPA: IAM 13540
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- 55 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..732
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:
- 60 **ATG AAA AAA ATA TTA TTA GCC ACA TTA AGC TGC GCC GCG TTG ACG CAG** 48
- Met Lys Lys Ile Leu Leu Ala Thr Leu Ser Cys Ala Ala Leu Thr Gln**
- 1 5 10 15**
- 65 **TTT TCC TTT GCC GCC AAA GAT GTC ACT ACC CAC CCT GAG GTT TAT TTT** 96
- Phe Ser Phe Ala Ala Lys Asp Val Thr Thr His Pro Glu Val Tyr Phe**
- 20 25 30**

ES 2 281 082 T3

	CTG CAA GAA TCA CAG TCC ATC GAC AGC CTG GCA CTA TTG CCG CCG CCG	144
	Leu Gln Glu Ser Gln Ser Ile Asp Ser Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro	
5	35 40 45	
	CCG GCG ATG GAC AGC ATT GAT TTC CTG AAT GAC AAA GCG CAA TAC GAC	192
	Pro Ala Met Asp Ser Ile Asp Phe Leu Asn Asp Lys Ala Gln Tyr Asp	
10	50 55 60	
	GCC GGG AAA ATA GTG CGC AAT ACT CCG CGT GGC AAG CAG GCT TAT GAT	240
	Ala Gly Lys Ile Val Arg Asn Thr Pro Arg Gly Lys Gln Ala Tyr Asp	
	65 70 75 80	
15	GAC GCC CAC GTT GCC GGG GAC GGC GTT GCC GCC GCA TTT TCC AAC GCC	288
	Asp Ala His Val Ala Gly Asp Gly Val Ala Ala Ala Phe Ser Asn Ala	
	85 90 95	
20	TTC GGC CTA GAA ATA GCC CAA CGG AAA ACG CCG GAG CTG TTT AAG CTG	336
	Phe Gly Leu Glu Ile Ala Gln Arg Lys Thr Pro Glu Leu Phe Lys Leu	
	100 105 110	
25	GTG ATG AAA ATG CGT GAA GAC GCC GGC GAT TTG GCG ACC CGC AGC GCC	384
	Val Met Lys Met Arg Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala	
	115 120 125	
30	AAA AAT CAC TAT ATG CGC ATT CGC CCC TTT GCG TTT TAT AAC GAA GCG	432
	Lys Asn His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Asn Glu Ala	
	130 135 140	
	ACC TGC CGA CCG GAC GAA GAA AGC ACC CTG TCG AAG AAC GGT TCT TAC	480
	Thr Cys Arg Pro Asp Glu Glu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Gly Ser Tyr	
35	145 150 155 160	
	CCT TCC GGC CAT ACC ACC ATC GGC TGG GCG ACC GCG CTG GTG CTG GCT	528
	Pro Ser Gly His Thr Thr Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala	
	165 170 175	
40	GAA ATC AAC CCC GCC AGG CAG GGT GAA ATC CTG CAG CGC GGC TAT GAT	576
	Glu Ile Asn Pro Ala Arg Gln Gly Glu Ile Leu Gln Arg Gly Tyr Asp	
	180 185 190	
45	ATG GGC CAA AGC CGG GTT ATC TGC GGT TAT CAC TGG CAA AGC GAC GTG	624
	Met Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val	
	195 200 205	
50	ACT GCG GCG CGC ATG GCG GCG TCG GCC ATG GTG GCG CGT TTG CAT GCC	672
	Thr Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Ala Met Val Ala Arg Leu His Ala	
	210 215 220	
55	GAA CCC ACC TTC GCC GCC CAG CTG CAA AAG GCC AAA GAC GAA TTC AAC	720
	Glu Pro Thr Phe Ala Ala Gln Leu Gln Lys Ala Lys Asp Glu Phe Asn	
	225 230 235 240	
	GGC CTG AAA AAG TAA	735
60	Gly Leu Lys Lys	

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:24:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 244 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido

ES 2 281 082 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Serratia ficaria*

(B) CEPA: IAM 13540

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

```

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

```