



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 488**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05721878 .6**
96 Fecha de presentación : **25.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1725663**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **γ -butirotetina hidroxilasa originada a partir de *Neurospora crassa*.**

30 Prioridad: **26.02.2004 KR 10-2004-0013032**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2011

73 Titular/es: **CJ CHEILJEDANG CORPORATION**
500 Namdaemunro 5-ga
Jung-gu, Seoul 100-749, KR

72 Inventor/es: **Chung, Sung Oh;**
Lee, Bheong-Uk;
Kang, Whan-Koo;
Ju, Jae Yeong;
Koh, Eun Sung;
Park, Sung-Sik y
Pakr, Young Hoon

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 362 488 T3

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

DESCRIPCION

Gamma-butirotetaina hidroxilasa originada a partir de *Neurospora crassa*.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al uso de un transformante que comprende un vector recombinante que comprende un polinucleótido, que codifica para γ -butirotetaina hidroxilasa, para preparar L-carnitina mediante la hidroxilación de γ -butirotetaina usando la γ -butirotetaina hidroxilasa codificada por el polinucleótido.

Antecedentes de la técnica

10 La L-carnitina (3-hidroxi-4-trimetilamino-butilato), que también se conoce como vitamina BT, es un análogo de vitamina natural que es muy importante en el metabolismo humano. Se aisló originalmente L-carnitina de tejido muscular bovino en 1905 por dos científicos rusos, Gulewitsch y Krimberg, y su estructura química se identificó en 1932. La L-carnitina se encuentra en casi todas las células del organismo y transporta ácidos grasos de cadena larga libres y activados a través de la membrana interna de la mitocondria. Debido a que la membrana mitocondrial interna es una barrera impenetrable para los ésteres de acil-CoA, los ácidos grasos de cadena larga libres, activados con ésteres de acil-CoA en el citoplasma, pasan a través de la membrana cuando se esterifican con L-carnitina. Cuando está presente L-carnitina en niveles bajos en los músculos esqueléticos, hígado, corazón y riñones, los ácidos grasos de cadena larga libres son difíciles de utilizar como fuente de energía. Este metabolismo anómalo de la carnitina provoca diversas enfermedades, incluyendo retraso del crecimiento, miocardiopatía y debilidad muscular. Cuando no se sintetiza L-carnitina en cantidades adecuadas en el organismo, la carnitina debe absorberse de los alimentos para evitar síntomas de deficiencia de carnitina. Especialmente en lactantes que no pueden biosintetizar L-carnitina, la L-carnitina es un nutriente esencial.

25 La L-carnitina se usa como componente activo en preparaciones farmacéuticas. Se requiere complementación exógena de L-carnitina para tratar la deficiencia de carnitina y otras enfermedades, especialmente enfermedades cardíacas. Recientemente, este uso terapéutico de la L-carnitina se ha hecho cada vez más importante (R. A. Frenkel y J. D. Mc Garry, "Carnitine biosynthesis, metabolism and functions", Academic Press, 1980).

30 Se ha identificado que la L-carnitina desempeña muchos papeles importantes en el organismo. Sin embargo, los métodos convencionales incluyendo la extracción biológica no son adecuados para la producción en masa de L-carnitina. Un método que puede facilitar la obtención de L-carnitina es utilizar DL-carnitina incluyendo isómeros ópticos. Este método provoca efectos secundarios en el organismo debido a que contiene D-carnitina (Curr. Ther. Res. 28, 195-198, 1980). En muchos casos, la D-carnitina compite con la L-carnitina en el organismo e interrumpe la beta-oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga libres. En pacientes que tienen una función renal notablemente reducida, este metabolismo alterado de ácidos grasos de cadena larga conduce a una inhibición más grave.

35 Se han realizado muchos esfuerzos para obtener L-carnitina ópticamente pura, que incluyen un método químico de resolución óptica (patente estadounidense n.º 5.166.426), un método biológico que usa microorganismos o enzimas (patente estadounidense n.º 5.187.093) y un método de producción de L-carnitina usando un compuesto quiral como compuesto de partida (patente estadounidense n.º 6.420.599 B2).

40 Entre los diversos métodos para obtener L-carnitina, un método biológico que usa microorganismos o enzimas emplea una enzima biológica, gamma-butirotetaina hidroxilasa, para producir L-carnitina ópticamente activa. Se aisló esta enzima en ratones y seres humanos (Rebouche y Engel, J Biol Chem 255:8700-8705, 1980), y se identificó su secuencia de nucleótidos. Los organismos superiores incluyendo los mamíferos utilizan un residuo de aminoácido de proteínas, lisina, como precursor para la biosíntesis de L-carnitina, mientras que *Neurospora crassa* produce L-carnitina ópticamente pura a partir de lisina libre (Fraenkel, Biol Bull, 104:359-371, 1953). El mecanismo de la biosíntesis de L-carnitina es en resumen tal como sigue. La síntesis de carnitina comienza con la metilación de la lisina mediante S-adenosilmetionina que actúa como donador de metilo, dando como resultado la formación de ϵ -N-trimetil-lisina. La trimetil-lisina se transforma enzimáticamente en β -hidroxi-trimetil-lisina. A partir de la β -hidroxi-trimetil-lisina sintetizada, se forma el trimetilaminobutilaldehído, y se convierte entonces en γ -butirotetaina.

50 Galagan *et al.* enseñan la secuencia completa del genoma de *Neurospora crassa* incluyendo una secuencia que codifica para una proteína no caracterizada supuesta, que tiene una secuencia representada por SEQ ID NO.2. Sin embargo, no se enseña que esta proteína tenga alguna actividad γ -butirotetaina hidroxilasa (γ -BBH) (Galagan J. E. et al., Nature, 422:859-868, 2003).

55 La patente estadounidense 4.371.618 A da a conocer que puede producirse L-carnitina usando los productos de liberación de *Neurospora crassa* y que las esporas de *Neurospora crassa* comprenden gamma-butirotetaina hidroxilasa.

Una secuencia de nucleótidos que codifica para γ -butirotetaina hidroxilasa, derivada de *Neurospora crassa* y que produce L-carnitina usando γ -butirotetaina, producida a través del mecanismo anteriormente mencionado, como precursor, no ha sido identificada antes de la presente invención.

Descripción de la invención

Basándose en estos antecedentes, los presentes inventores identificaron un gen que codifica para γ -butirotetaina hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa*, y produjeron con éxito L-carnitina a partir de γ -butirotetaina mediante un método biológico empleando γ -butirotetaina hidroxilasa expresada usando el gen.

5 Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que:

10 La figura 1 muestra los resultados de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) de sobrenadantes de centrifuga de lisados celulares de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 que no contiene el gen de γ -butirotetaina hidroxilasa (γ -BBH) y *E. coli* BL21 que contiene el gen de γ -BBH e inducido por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido);

La figura 2 muestra los resultados de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de un gen de ADNc de γ -BBH clonado en pT7-7;

15 La figura 3 es una alineación de secuencias múltiple en el que se alinea una secuencia de aminoácidos de γ -BBH de *Neurospora crassa* frente a la del ser humano, rata y γ -BBH derivada de *Pseudomonas*;

La figura 4 es una presentación esquemática de un plásmido pT7-BBH2; y

La figura 5 es un diagrama esquemático de un procedimiento de producción de L-carnitina a partir de γ -butirotetaina.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

20 En un aspecto, la presente invención se proporciona el uso de un transformante según la reivindicación 1.

Con el fin de obtener un gen que codifique para γ -butirotetaina hidroxilasa derivada del hongo filamentoso *Neurospora crassa*, los presentes inventores compararon en primer lugar genes heterogéneos que codifican para γ -butirotetaina hidroxilasa para encontrar regiones conservadas. Se realizó una búsqueda de homología entre las regiones conservadas y las secuencias génicas completas de *N. crassa*, registradas en la base de datos de genes. A partir de genes que tienen secuencias parcialmente similares, se seleccionó un gen candidato que mostraba actividad γ -butirotetaina hidroxilasa. Con el fin de clonar el gen candidato, se sintetizaron cebadores específicos para el gen. Se preparó una biblioteca de ADNc de *Neurospora crassa* y se examinó para detectar el gen diana usando los cebadores sintetizados. Se insertó el clon de ADNc así obtenido en un vector apropiado. Se transformó el vector recombinante resultante en *Escherichia coli*, y se encontró que la clonación del gen fue exitosa mediante experimentos usando el transformante. Se indujo la expresión de la proteína del gen portado por el vector recombinante mediante tratamiento con IPTG y se analizó mediante SDS-PAGE. En comparación con un control, se encontró que un transformante de *E. coli* que muestra expresión de proteínas específica produce L-carnitina usando γ -butirotetaina como sustrato (tabla 1).

35 La presente invención se basa en el hallazgo de un gen que codifica para γ -butirotetaina hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa*, identificándose el gen tal como se describió anteriormente y no habiéndose identificado como enzima antes de la presente invención. Una secuencia de polinucleótido de γ -butirotetaina hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa*, que se ha identificado por los presentes inventores, se representa mediante SEQ ID NO. 1.

40 Se describen también mediante la presente invención variantes, por ejemplo, fragmentos y derivados, del polinucleótido de SEQ ID NO. 1 que codifica para un polipéptido que tiene actividad γ -butirotetaina hidroxilasa, siempre que se expresen en una forma que contenga un gen que tenga la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO. 1.

45 En otro aspecto, la presente invención describe un polinucleótido que codifica para una proteína que tiene una homología del 70% o superior con el polinucleótido de SEQ ID NO. 1 y tiene actividad γ -butirotetaina hidroxilasa.

El término "homología", tal como se usa en el presente documento para una secuencia de polinucleótido o una proteína o polipéptido codificado por la secuencia de polinucleótido, indica la similitud de secuencia entre secuencias de aminoácidos de tipo natural o secuencias de nucleótidos de tipo natural. En el caso de una proteína, "homóloga" incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al 75% o superior, preferiblemente al 85% o superior, más preferiblemente al 90% o superior e incluso más preferiblemente al 95% o superior a la secuencia de aminoácidos de una proteína γ -butirotetaina hidroxilasa según la presente invención. Normalmente, un homólogo de proteína puede incluir un sitio activo idéntico a de una proteína diana. En el caso de un gen, "homólogo" incluye una secuencia génica idéntica al 75% o superior, preferiblemente al 85% o superior, más preferiblemente al 90% o superior e incluso más preferiblemente al 95% o superior a una secuencia de polinucleótido que codifica para una proteína γ -butirotetaina hidroxilasa según la presente invención. La evaluación de la homología puede realizarse a

simple vista o usando un programa disponible comercialmente. Usando un programa informático disponible comercialmente, la homología entre dos o más secuencias puede expresarse como un porcentaje (%), y puede evaluarse la homología (%) entre secuencias adyacentes.

5 La presente invención describe un polinucleótido que codifica para una proteína que tiene una homología del 75% o superior, preferiblemente del 85% o superior, más preferiblemente del 90% o superior e incluso más preferiblemente del 95% con la secuencia de SEQ ID NO. 1 y tiene actividad γ -butirobetaína hidroxilasa.

La presente invención describe un polinucleótido que codifica para γ -butirobetaína hidroxilasa representado por SEQ ID NO. 2.

10 Puede producirse γ -butirobetaína hidroxilasa a gran escala según la presente invención insertando un gen de polinucleótido que codifica para γ -butirobetaína hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa* en un vector e induciendo la expresión de la proteína usando el vector recombinante resultante.

Por tanto, aún en otro aspecto, la presente invención describe un vector recombinante que comprende un gen de polinucleótido que codifica para γ -butirobetaína hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa*.

15 El término "vector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN operativamente unida a secuencias reguladoras que pueden controlar la expresión de una proteína en un huésped adecuado y secuencias introducidas para facilitar otra manipulación genética u optimizar la expresión de la proteína. Tales secuencias reguladoras incluyen un promotor para el control de la transcripción, un operador añadido selectivamente para el control de la transcripción, un sitio de unión de ARNm a ribosomas adecuado y secuencias que controlan la terminación de la transcripción/traducción. Un vector de este tipo
20 para la inserción de un gen exógeno puede ser un plásmido, un virus, un cósmido o similares.

El vector incluye vectores de clonación y vectores de expresión. El vector de clonación es un plásmido que puede replicarse en el que se inserta ADN exógeno, y suministra el ADN exógeno a células huésped transformadas con el mismo. "Vector de expresión" significa normalmente un portador en el que se inserta un fragmento de ADN exógeno, generalmente un fragmento de ADN bicatenario. "ADN exógeno" se refiere a ADN heterogéneo que no se produce de manera natural en las células huésped. El vector de expresión puede replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped en células huésped de modo que puede producirse el ADN exógeno insertado. Tal como se conoce generalmente en la técnica, con el fin de aumentar el nivel de expresión de un gen transfectado en una célula huésped, el gen debe estar operativamente unido a las secuencias reguladoras de la transcripción y traducción funcionales en una célula huésped seleccionada como sistema de expresión.

30 Se depositó un vector pT7-BBH2 (*Escherichia coli* DH5 α CJ2004), que se construye para su uso en la presente invención para la expresión de un polinucleótido que codifica para γ -butirobetaína hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa*, en una autoridad de depósito internacional, el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 27 de enero del 2004, y se le asignó el número de registro KCCM-10557.

35 Aún en otro aspecto, la presente invención describe el uso de un transformante transformado con un vector recombinante que comprende el gen.

El término "transformación", tal como se usa en el presente documento, significa la introducción de ADN en una célula huésped adecuada de modo que el ADN pueda replicarse, o bien como un elemento extracromosómico, o bien mediante integración cromosómica. Las células huésped útiles para la transformación según la presente invención pueden ser procariotas o eucariotas. Además, pueden usarse normalmente células huésped que tienen alta eficacia de introducción de ADN foráneo y que tienen altos niveles de expresión de ADN introducido. Los ejemplos de células huésped incluyen células procariotas y eucariotas, tales como bacterias, por ejemplo, *Escherichia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y *Streptomyces sp.*, hongos y levaduras, células de insecto tales como *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y células animales tales como CHO, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 y BMT 10. Puede usarse preferiblemente *Escherichia coli*.

45 Se representa una secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido de SEQ ID NO. 1 mediante SEQ ID NO. 2. Por tanto, todavía en otro aspecto, la presente invención describe la γ -butirobetaína hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa* y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2.

50 Todavía en otro aspecto, la presente invención describe la γ -butirobetaína hidroxilasa seleccionada del grupo que consiste en variantes que tienen una homología del 75% o superior, preferiblemente del 85% o superior, más preferiblemente del 90% o superior e incluso más preferiblemente del 95% con la secuencia de SEQ ID NO. 2 y tienen actividad γ -butirobetaína hidroxilasa.

Tal como se muestra en la figura 5, puede usarse la γ -butirobetaína hidroxilasa descrita mediante la presente invención para producir L-carnitina a partir de γ -butirobetaína, obteniendo de ese modo L-carnitina ópticamente pura.

55 Por tanto, todavía en otro aspecto, la presente invención enseña un método de preparación de L-carnitina que comprende la hidroxilación de γ -butirobetaína usando la γ -butirobetaína hidroxilasa mencionada anteriormente.

Puede usarse la L-carnitina obtenida tal como se describió anteriormente como complemento de L-carnitina para tratar la deficiencia de carnitina y otros fines terapéuticos.

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar pero no deben interpretarse como límite de la presente invención.

5 EJEMPLO 1: Construcción de la biblioteca de ADNc de *Neurospora crassa*

Con el fin de obtener ADNc de *Neurospora crassa*, en primer lugar se aisló ARNm de *Neurospora crassa*, y se sintetizó ADNc a partir del ARNm aislado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando un cebador poliT. Se insertó el ADNc en sitios EcoRI/XhoI de un vector de clonación AD5, y se preparó un conjunto de ADNc construido en un plásmido tal como sigue. Se cultivó la cepa de *Escherichia coli* BNN322 en medio LB complementado con kanamicina y maltosa al 0,2% durante la noche, se recogió mediante centrifugación y se suspendió en 1 ml de MgSO₄ 10 mM. Se cultivó la suspensión bacteriana con 3,5x10⁷ fagos λ que poseen un conjunto de ADNc durante 30 min. a 30°C sin agitación. Tras añadir 2 ml de medio LB al cultivo, se cultivó la cepa infectada durante 60 min. a 30°C con agitación. Se extendió el cultivo resultante en placas LB que contenían ampicilina (75 µl/ml). Se aislaron plásmidos de las colonias que surgen, creando así un conjunto de biblioteca de ADNc.

EJEMPLO 2: Preparación de cebadores para obtener el gen de γ -butirobetaína hidroxilasa

Se comparó la secuencia de aminoácidos de γ -butirobetaína hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa* (γ -BBH) con la del ser humano, la rata y γ -BBH derivada de *Pseudomonas* (figura 3). La secuencia 1 representa la secuencia de aminoácidos de γ -BBH derivada de *N. crassa*, la secuencia 2 la de γ -BBH derivada de ser humano, la secuencia 3 la de γ -BBH derivada de rata y la secuencia 4 la de γ -BBH derivada de *Pseudomonas*. Los resultados de la homología de secuencia son tal como sigue (inicio de las alineaciones por parejas)

Secuencias (1:2) alineadas. Puntuación: 11%

Secuencias (1:3) alineadas. Puntuación: 11%

Secuencias (1:4) alineadas. Puntuación: 10%

25 Secuencias (2:3) alineadas. Puntuación: 88%

Secuencias (2:4) alineadas. Puntuación: 29%

Secuencias (3:4) alineadas. Puntuación: 29%.

Se encontró que γ -BBH derivada de *N. crassa* tiene un 11% de homología con γ -BBH derivada de ser humano.

30 Se diseñó un conjunto de cebadores, a continuación, para clonar γ -BBH derivada de *N. crassa* basándose en la información de secuencia del genoma de *N. crassa*.

Cebador 1 (SEQ ID NO. 3):

5'- ATG AAT TCC ATA TGA TGG CCA CGG CAG CGG TTC AG -3'

Cebador 2 (SEQ ID NO. 4):

35 5'- ATT AGT CGA CTC AAT ACC CTC CCC CAC CCT G -3'

EJEMPLO 3: Obtención del gen que codifica para γ -BBH

Se amplificó el gen de γ -BBH a partir de la biblioteca de ADNc de *Neurospora crassa*, preparada en el ejemplo 1, mediante PCR usando un conjunto de cebadores preparado en el ejemplo 2. Se sometió a electroforesis el producto de PCR en un gel de agarosa, y se observó una banda a aproximadamente 1,4 kb. Se determinó la secuencia de nucleótidos del gen amplificado mediante secuenciación de ADN automática. Además, se sometió la secuencia de nucleótidos determinada a búsquedas de homología para detectar secuencias de nucleótidos usando el programa BLAST del NCBI. Como resultado, se encontró un gen el 100% idéntico al gen amplificado en la secuencia del genoma de *Neurospora crassa*, y se mencionó que la función del producto de traducción del gen encontrado era sólo como una proteína hipotética. Entonces, se digirió el producto de PCR tanto con EcoRI como Sall, se ligó con pUC19 digerido con las mismas enzimas de restricción y se introdujo en *Escherichia coli* DH5. Se identificó un transformante mediante selección blanco/azul. Cuando se aisló el plásmido del transformante y se analizó, se encontró que el gen de γ -butirobetaína hidroxilasa se había insertado con éxito en el plásmido.

EJEMPLO 4: Construcción del plásmido pT7-BBH2

50 Se digirió el plásmido obtenido que contiene el gen de γ -butirobetaína hidroxilasa con NdeI y Sall, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó el fragmento de ADN

correspondiente al gen de γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa del gel, se purificó y se insertó en pT7-7 tratado con NdeI y Sall (figura 4). Se transformó el plásmido resultante en *Escherichia coli* DH5 y se hizo crecer en placas sólidas que contenían ampicilina. A partir de las colonias que surgen, se aisló el plásmido recombinante. Cuando se digirió el plásmido recombinante con NdeI y Sall, se encontró que el gen de γ -BBH se había insertado con éxito en el plásmido (figura 2). Por tanto, se designó el plásmido recombinante como "pT7-BBH2". Se introdujo este plásmido recombinante en *Escherichia coli* DH5 α . Se designó el transformante resultante como "*Escherichia coli* DH5 α CJ2004", se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 27 de enero del 2004 y se le asignó el número de registro KCCM-10557.

10 EJEMPLO 5: Transformación del plásmido pT7-BBH2 en la cepa bacteriana de expresión *Escherichia coli* BL21(DE3)

Se transformó el plásmido pT7-BBH2 que tiene un marcador de selección de ampicilina en una cepa bacteriana de expresión, *Escherichia coli* BL21(DE3). La cepa *E. coli* BL21(DE3) produce ARN polimerasa de T7 en presencia de lactosa o IPTG, que induce la traducción del gen de γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa. Se extienden las células transformadas en medio sólido que contiene ampicilina. A partir de las colonias que surgen, se purificó y digirió el plásmido con NdeI y Sall para examinar el tamaño del gen insertado y el plásmido. Como resultado, se encontró que el plásmido pT7-BBH2 se había introducido con éxito en la cepa *E. coli* BL21(DE3).

EJEMPLO 6: Expresión de γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa

Se cultivó el transformante BL21(DE3)/pT7-BBH2, que se preparó en el ejemplo 5 mediante la transformación del plásmido pT7-BBH2 en *E. coli* BL21(DE3), para evaluar la expresión de γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa. Se cultivó el transformante en un matraz con deflectores de 250 ml que contenía 50 ml de medio LB o medio LB complementado con ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó un valor de DO600 de 0,6, se añadió IPTG 1 mM al medio, y se cultivaron las células adicionalmente durante 4 h. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4.000xg durante 15 min. y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (NaCl 140 mM, glicerol 200 g/litro, DTT 1 mM, tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4). Se colocó la suspensión celular en hielo y se sometió a ultrasonificación durante 10 s cinco veces usando un aparato de ultrasonificación para romper las células. Entonces, se centrifugaron las células rotas a 10.000xg durante de 20 a 30 min. a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, y se desecharon los residuos celulares. El análisis de SDS-PAGE mostró una banda a aproximadamente 49 kDa que corresponde al tamaño de la γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa (figura 1). Se determinaron las concentraciones de proteína mediante el ensayo Bradford según el uso previsto.

30 EJEMPLO 7: Medición de L-carnitina

Se incubó un extracto bruto de *Neurospora crassa* en 500 μ l de tampón de ensayo (KCl 20 mM, cetoglutarato 3 mM, ascorbato de sodio 10 mM, Triton X-100 2 g/litro, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 0,25 mM, butirotetrahidroxiacetiltransferasa 0,2 mM, tampón fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0) durante 1 h a 37°C. Se mezclaron 500 μ l del sobrenadante del extracto con 500 μ l de ácido perclórico 1,2 M. Se incubó la mezcla durante 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó durante 5 min. Se mezclaron 600 μ l del sobrenadante con 320 μ l de K₃PO₄ 0,7 M y se incubó en un baño de hielo durante 20 min. Tras centrifugarse la mezcla durante 5 min., se diluyeron 750 μ l del sobrenadante en 250 μ l de agua destilada estéril. Se complementó el sobrenadante diluido con 100 μ l de DNTB/H₂O₂ y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. Entonces, se complementó la mezcla de reacción con 50 μ l de una disolución de catalasa, incubada a temperatura ambiente durante 30 min., y se centrifugó. Se mezcló 1 ml del sobrenadante con 50 μ l de acetil CoA y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se midió la absorbancia a 405 nm y se calculó la concentración de L-carnitina.

EJEMPLO 8: Evaluación de la γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa derivada de *N. crassa* para determinar la capacidad de producir L-carnitina utilizando γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa como sustrato

Se cultivó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), transformada con el gen de γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa en el ejemplo 5, en un matraz con deflectores de 250 ml que contenía 50 ml de medio LB o medio LB complementado con ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó un valor de DO600 de 0,6, se añadió IPTG 1 mM al medio, y se cultivaron las células durante más de 8 h a 25°C con el fin de prevenir la formación de cuerpos de inclusión mientras que se inducía la formación de una estructura terciaria de la proteína precisa. Entonces, se recogieron las células mediante centrifugación a 4.000xg durante 15 min., y se preparó un extracto bruto de proteína según el mismo método que en el ejemplo 6. Se incubó el extracto bruto que contenía proteínas 1,0 mg/ml en un tampón de reacción que contenía γ -butirotetrahidroxiacetiltransferasa 0,5 mg/ml durante 4 h. Se determinó la concentración de L-carnitina según el mismo método que en el ejemplo 7, y los resultados se facilitan en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1

Mezcla de ensayo	Conc. de L-carnitina (µg/ml)
Tampón de ensayo de γ -BBH + extracto bruto de BL21(DE3) 1,0 mg/ml	0,0
Tampón de ensayo de γ -BBH + extracto bruto de BL21(DE3)/Pt7-BBH2 1,0 mg/ml (inducido por IPTG)	0,8

Aplicabilidad industrial

- 5 Tal como se describió anteriormente en el presente documento, el gen que codifica para γ -butirobetaína hidroxilasa derivada de *Neurospora crassa* es útil para producir L-carnitina ópticamente pura a partir de γ -butirobetaína.

Lista de secuencias

<110> CJ Corp.

5 <120> gamma-butirobetaína hidroxilasa originada a partir de *Neurospora crassa*

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

10

<210> 1

<211> 1346

<212> ADN

<213> *Neurospora crassa*

15

<400> 1

atggccacgg cagcgggtca ggttcagtc ccagctccgg ttggacaacc agatatcggg	60
tacgtcctg accacgaaa gtacctgca agagtcaaaa gacgacgaga aaacgagaag	120
ctggagtcgt ctctccgcc aggttccct cgaagactag actcggacct tgtgtgggac	180
ggcaacaccc tcgccgagac gtacgactgg acctacagac tgacagaaga ggccattgat	240
gaaatcgagg ccgcgcttcg tcattttaag agttagtaca gaatctctcc ttcctgtcct	300
tgggcatcaa gccatcaact aaccatcacc gcatgacagg cctcaacaag ccctaggct	360
acatcaacca agaaacctc cccttcccc gcctacacca cactctccgc tcctctccc	420
acgagctcca ccacggccac ggcttcaaag tctccgcgg gctccccgtc acctccata	480
cacgcgagga aaacatcatc atctacgcc gcgctctctc gcatgtcgt cctatccgcg	540
gccgccagga caaccagcac aacggccacc cagccgacgt agtcctagca cacatcaaag	600

acctgtccac gactgtttct gacgtgagca aaatcgggtgc acccgcctac accaccgaga 660

aacaagtctt ccacaccgac gcaggcgaca tcgtcgcctt cttttgcttg ggagaggccg 720

ccgagggcgg acagagttac ctgtccagca gctggaaggt gtacaacgag ctggcagcca 780

ctcggcccga tctggttcgc acgtggcgg agccgtgggt ggcggacgag tttggcaagg 840

aaggaggaa gttttctgtg cgaccgctt tgcatittca gtctactgct gctgctgctt 900

ctaggaagc aaagcccagag tctgaacggc tcatcatcca gtacgccgc cgcacgtta 960

cggggattg gggattaccg aggtcggcgg atatccgcc cattacggag gcgcaggcgg 1020

aggcgttga tgcgctgcac ttacggcgg agaagtacgc ggtggcgtg gattcaggc 1080

aggggatgt ccagttgtg aataactga gtgtgtcca ttcgaggcg gggttagag 1140

atgagggga gaagcagagg catttggtta ggttgggtt gagagatccg gagaatgcgt 1200

gggagacgcc cgaggcgtt aaggaacggt gggaacgct gtatggcggg tgagtccgg 1260

agagggagt gtttcgctt gagccgaga ttaggagcgc gagtaagggg gagagcgtg 1320

ggacgcaggg tgggggaggg tattga 1346

<210> 2

<211> 425

5 <212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 2

Met Ala Thr Ala Ala Val Gln Val Ser Val Pro Ala Pro Val Gly Gln

1

5

10

15

Pro Asp Ile Gly Tyr Ala Pro Asp His Asp Lys Tyr Leu Ala Arg Val
 20 25 30

Lys Arg Arg Arg Glu Asn Glu Lys Leu Glu Ser Ser Leu Pro Pro Gly
 35 40 45

Phe Pro Arg Arg Leu Asp Ser Asp Leu Val Trp Asp Gly Asn Thr Leu
 50 55 60

Ala Glu Thr Tyr Asp Trp Thr Tyr Arg Leu Thr Glu Glu Ala Ile Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Glu Ala Ala Leu Arg His Phe Lys Ser Leu Asn Lys Pro Leu
 85 90 95

Gly Tyr Ile Asn Gln Glu Thr Phe Pro Leu Pro Arg Leu His His Thr
 100 105 110

Leu Arg Ser Leu Ser His Glu Leu His His Gly His Gly Phe Lys Val
 115 120 125

Leu Arg Gly Leu Pro Val Thr Ser His Thr Arg Glu Glu Asn Ile Ile
 130 135 140

Ile Tyr Ala Gly Val Ser Ser His Val Ala Pro Ile Arg Gly Arg Gln
 145 150 155 160

Asp Asn Gln His Asn Gly His Pro Ala Asp Val Val Leu Ala His Ile
 165 170 175

Lys Asp Leu Ser Thr Thr Val Ser Asp Val Ser Lys Ile Gly Ala Pro
 180 185 190

Ala Tyr Thr Thr Glu Lys Gln Val Phe His Thr Asp Ala Gly Asp Ile
 195 200 205

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

Leu Ser Ser Ser Trp Lys Val Tyr Asn Glu Leu Ala Ala Thr Arg Pro
 225 230 235 240

Asp Leu Val Arg Thr Leu Ala Glu Pro Trp Val Ala Asp Glu Phe Gly
 245 250 255

Lys Glu Gly Arg Lys Phe Ser Val Arg Pro Leu Leu His Phe Gln Ser
 260 265 270

Thr Ala Ala Ala Ala Ser Arg Glu Ala Lys Pro Glu Ser Glu Arg Leu
 275 280 285

Ile Ile Gln Tyr Ala Arg Arg Thr Phe Thr Gly Tyr Trp Gly Leu Pro
 290 295 300

Arg Ser Ala Asp Ile Pro Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ala Glu Ala Leu
 305 310 315 320

Asp Ala Leu His Phe Thr Ala Glu Lys Tyr Ala Val Ala Leu Asp Phe
 325 330 335

Arg Gln Gly Asp Val Gln Phe Val Asn Asn Leu Ser Val Phe His Ser
 340 345 350

Arg Ala Gly Phe Arg Asp Glu Gly Glu Lys Gln Arg His Leu Val Arg
 355 360 365

Leu Trp Leu Arg Asp Pro Glu Asn Ala Trp Glu Thr Pro Glu Ala Leu
 370 375 380

Lys Glu Arg Trp Glu Arg Val Tyr Gly Gly Val Ser Pro Glu Arg Glu
 385 390 395 400

Val Phe Pro Leu Glu Pro Gln Ile Arg Ser Ala Ser Lys Gly Glu Ser
 405 410 415

Val Gly Thr Gln Gly Gly Gly Gly Tyr
 420 425

<210> 3

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para amplificar el gen de gamma-butirotetrahidrocolina hidroxilasa originada a partir de *Neurospora crassa*

10

<400> 3

atgaattcca tatgatggcc acggcagcgg ttcag 35

<210> 4

15 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

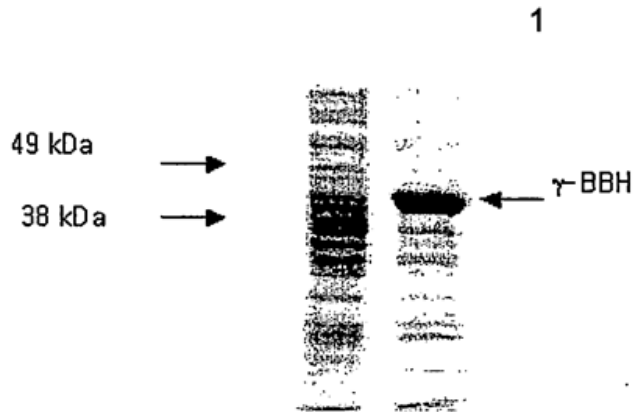
20 <223> Cebador para amplificar el gen de gamma-butirotetrahidrocolina hidroxilasa originada a partir de *Neurospora crassa*

<400> 4

attagtcgac tcaatacct cccccacct g 31

REIVINDICACIONES

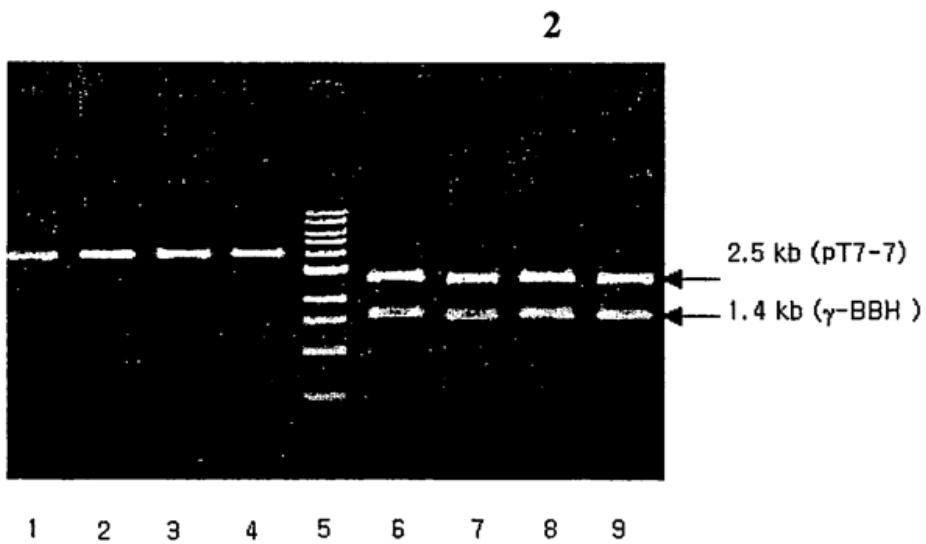
- 5
1. Uso de un transformante que comprende un vector recombinante que comprende un gen que se selecciona del grupo que consiste en un polinucleótido representado por SEQ ID NO 1 y un polinucleótido que codifica para gamma-butirobetaína hidroxilasa representado por SEQ ID NO 2, para preparar L-carnitina, que comprende la hidroxilación de la gamma-butirobetaína.
 2. Uso de un transformante según la reivindicación 1, en el que el transformante es *Escherichia coli*.
 3. Uso de un transformante según la reivindicación 2, en el que el transformante es *Escherichia coli* KCCM-10557 .



Carril 1: Marcador de tamaño molecular de proteínas

Carril 2: *E. coli* BL21 sin gen de γ - BBH

Carril 3: *E. coli* BL21 con gen de γ - BBH e inducido mediante IPTG 1 mM



Carril 1 - 4: pT7-7 + plásmido γ - BBH digerido con Nde I

Carril 5: marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb

Carril 6 - 9: pT7-7 + plásmido γ - BBH digerido con Nde I y Sal I

Alineación de secuencias múltiple CLUSTAL W (1.82)

```

Ser humano  -----MACTIQKAEALDGAHLNQILWYDEEESLYPAVWLRDNCPCSDCVLDSAKARK 52
rata        -----MHCAILKAEAVDGAFLNQIFWHDGAESLYPAVWLRDNCQCSDCYLHSAKARK 52
pseudomonas NA IADYRTFPLI SPLASAAASFASGVSVTWADGRVSPFHNLWLRDNCPCGDCVYEVTRQV 60
N. crassa   -----MATAAVQVSPAPVGPDPIDGYAPDHDKYLARVKRRRENEKLESSLPPG---- 48
           :   . . . . . : : . . . : * : . :

Ser humano  LLVEALDYNIGIKGLIFDRK-KVYIT@PDEHYSEFQAD@LKKKRCFSKQARAKLQRELF 111
rata        LLEALDYNIRMDLTFDQK-KVYIT@PNGHYSEFEAN@LKKKRCFSQEARAGLQGELFLP 111
pseudomonas FLVADVPEIDIQVQAVTIGDDGRLVYVQ@DDGHASAYHPG@LRAHAYDAQSLA-EREAA 118
N. crassa   -FPRRLDSDLVW@DGNTLAETVD@VYRLTEEAIDEIEAALRHFKSLNKPLGVINQETFLP 107
           : : : : . : : : . . . : : . : *

Ser humano  ECQY@GSELQLPTLDFEDVLRVDEHAYK@LSTLKKVGI VRLTGASDKPGEVSKLGRKRGF 171
rata        ECQY@GSELQLPTLNFEDVLRNDDHAYK@LSSLKKVGI VRLTGAADKAGEIKLGRKIGF 171
pseudomonas HKHR@MQGLSLPVYDHGAYMQDDDTLE@LLAVRDVGLTQLHGVPTEPGALIPAKRI 178
N. crassa   RLHHTLRSLSHLHGHGFKVLR--GLPYTSHTRREENIIIVAGVSSHVAPIRGRQDNQ-H 164
           . : * . . . . : : : * . . . : . . .

Ser humano  LYLTFYGH@QVQDKIDANNVAVTTGKLSFHTDYPALHHPG-VQLLHCKQTVTGGDSE 230
rata        LYLTFYGH@QVQDKIDANNVAVTTGKLSFHTDYPALHHPG-VQLLHCKQTVTGGDSE 230
pseudomonas IRESNFGVLFVRSKADADSNAYTAFNLPLHTDLPTRQLPG-LQFLHCLYNDATGGNST 237
N. crassa   NGHPADVYLAHIKDLSTVSDVSKI GAPAYTTEKQVFHTDAGDIVALFCLGEAAEGGQSY 224
           . . . . : . . . . * : . . . * : * . : : . ** : *

Ser humano  IVDGFNVCQKLKKNPQAFQILSS--TFYDFTDIGY-----DYCDFSYQSKHKIIELDDK 283
rata        IVDGFNVCQKLKKNPQAFQILSS--TFYDFTDIGY-----DYCDFSYQSKHKIIELDDK 283
pseudomonas FVDGFAIAEALRIEAPAAVRLICE--TPYEFANK-----DRHSDYRCTAPVIALDSS 287
N. crassa   LSS@KVVNELAATRPDLVRTLAEP@VADEFGKEGRKFSYRPLLHFQSTAAAASREAKPE 284
           : . : : : * * * . . . : * . . . . .

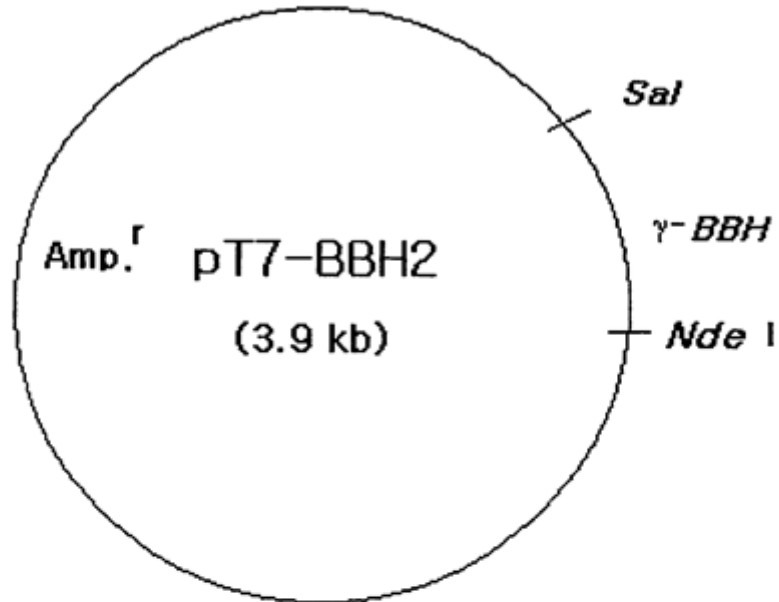
Ser humano  GQVYRINFNATRDITFDVP-VERVQPFYAALKEFVDMN--SKESKFTFKMNPGDVITF 340
rata        GQVYRINFNATRDITFDVP-IERVQPFYAALKEFVDMN--SKEYKYTFKMNPGDVITF 340
pseudomonas GEVREIRLANFLR-APFQMD-AQRMPDYLLAVRRFIQNTA-EPRFCFTRRLEAGQLWCF 343
N. crassa   SERLIQVARRFTGY@GLPRADIPPI TEAQAEALDALHFTAKEYAYALDFRQGDVQFV 344
           . : * . . . : : : * . . . : : : . : : * : :

Ser humano  DNWRLLHGRRSVEAGTEISRHLEGAYAD-----@DVVNS-----RLRIL 379
rata        DNWRLLHGRRSVEAGTEISRHLEGAYAD-----@DVVNS-----RLRIL 379
pseudomonas DNRRVYLHARDAFDP-ASGDRHFQGCYVD-----RDELLS-----RILVL 381
N. crassa   NNL SYFHSRAGFRDEGEKQRHLVRL@LRDPENAW@ETPEALKERWERVYGGVSPEREVFL 404
           : * : : * . : . . : : : : : : : : *

Ser humano  RQRVNGN----- 387
rata        RQRVNGN----- 387
pseudomonas QR----- 383
N. crassa   EPQIRSAKGESYGTQGGGGY 425
    
```

(Las secuencias se alinearon usando el programa de análisis de secuencias del Instituto de Bioinformática Europeo (EMBL-EBI), clustalW.)

4



5

