

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 667**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2014 PCT/EP2014/078984**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15097148**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2014 E 14819001 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3087178**

54 Título: **Método para producir oxalato oxidasas que tienen actividad óptica cerca de pH fisiológico y uso de tales oxalato oxidasas recombinantes en el tratamiento de enfermedades relacionadas con oxalato**

30 Prioridad:

23.12.2013 EP 13199309

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.12.2018

73 Titular/es:

**NEXTOBE AB (100.0%)
Dag Hammarskjölds väg 40
751 83 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**WANG, YI;
WANG, XIAOFENG;
LIU, HAIFENG y
WANG, WEI**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 694 667 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir oxalato oxidasas que tienen actividad óptica cerca de pH fisiológico y uso de tales oxalato oxidasas recombinantes en el tratamiento de enfermedades relacionadas con oxalato

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades relacionadas con oxalato y proporciona oxalato oxidasas (OxOx) que tienen una actividad adecuada cerca de pH fisiológico (7,4). Las propiedades de estas OxOx hacen que sean posibles candidatos a fármaco para su uso en la reducción de la concentración de oxalato en pacientes que presentan exceso de oxalato. Especialmente debido a la alta actividad a pH fisiológico, las OxOx son candidatos a fármaco adecuados para administración parenteral, es decir para reducir la concentración de oxalato en el plasma.

10

15 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de cálculos en las vías urinarias/renales (urolitiasis) es un problema sanitario importante en todo el mundo. La mayor parte de los cálculos asociados con urolitiasis se componen de oxalato de calcio solo u oxalato de calcio más fosfato de calcio.

20

Muchos estados patológicos se asocian con una cantidad en exceso de oxalato en el cuerpo, incluyendo: hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria secundaria, autismo, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis, urolitiasis, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, sarcoidosis, asma, EPOC, fibromialgia, síndrome de Zellweger, cirugía bariátrica y otros estados patológicos entéricos.

25

El oxalato puede absorberse a través de todo el tracto gastrointestinal incluyendo el estómago y el intestino delgado y grueso. Por tanto, la retirada de oxalato de la dieta en estos órganos es eficaz en la prevención de la absorción de oxalato. La absorción de oxalato de la dieta contribuye al 10-70% de la secreción de oxalato en orina. Se cree que el exceso de las concentraciones de oxalato de calcio es responsable de la formación de cálculos. Por tanto, al reducir la concentración de oxalato, disminuirá el riesgo de formación de cálculos.

30

Existen muy pocas, si hay alguna, estrategias de tratamiento que se sepa que disminuyen significativamente el riesgo de formación de cálculos. Los principales enfoques han sido limitar la absorción de oxalato de la dieta mediante la administración por vía oral de bacterias o enzimas degradadoras de oxalato, que entran en contacto con el contenido del estómago y el intestino. El reto al proporcionar tal tratamiento es el duro entorno ácido del estómago, que puede degradar la enzima de modo que se vuelve ineficaz a bajo pH y en un entorno de alta actividad pepsina. El intestino también representa un reto debido a la presencia de tripsina y quimiotripsina y debido a un pH que se aproxima a pH neutro. La mayor parte de las enzimas degradadoras de oxalato conocidas tienen actividad óptima a pH que es un pH ácido. El reto cuando se usan bacterias degradadoras de oxalato es pasar por el entorno gástrico sin perder la actividad de las bacterias y tener las bacterias colonizadas en el intestino. Se ha hecho un intento para administrar por vía oral una composición con recubrimiento entérico.

35

40

Todas las oxalato oxidasas de tipo germinal notificadas en la bibliografía son activas en ácido y no se ha confirmado la oxalato oxidasa notificada con actividad a pH mayor de 7 como una única proteína purificada con secuencia génica. El documento WO 2011/066282 describe enzimas degradadoras de oxalato derivadas de hongos. El ejemplo 5 del documento WO 2011/066282 no ha aislado la enzima y no se proporciona información sobre la secuencia de proteína. Los presentes inventores han tratado de purificar cierta cantidad de esta enzima, pero fracasaron.

45

Makoto K. *et al.* en Journal of the Institute of Brewing, vol. 115, 2009, 232-237 describen enzimas derivadas de cebada y malta, pero concluyen que la enzima parece ser una flavoproteína (véase la página 235, 1ª columna). Los presentes inventores han repetido el experimento descrito en Makoto *et al.* Usando exactamente la misma semilla de cebada, pero fracasaron en hallar actividad oxidasa a pH 7,4.

50

Sin embargo, todavía existe la necesidad de estrategias de tratamiento, que reduzcan eficazmente la concentración de oxalato en el cuerpo.

55

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una estrategia de tratamiento novedosa para disminuir la concentración de oxalato en el cuerpo. La estrategia se basa en el hallazgo de oxalato oxidasas que tienen actividad óptima o suficiente a pH 7,4 y, por tanto, pueden reducir la concentración de oxalato en la sangre después de administración parenteral. Usando la ruta de administración parenteral, se evitan problemas relacionados con la degradación de las enzimas en el tracto gastrointestinal combinada con la necesidad de tener un pH en el que la enzima es activa. Sin embargo, un prerrequisito para la estrategia de tratamiento es que la(s) enzima(s) sea(n) activa(s) a pH fisiológico (pH 7,4). Hasta ahora sólo se ha descrito una oxalato oxidasa, que tiene cierta actividad a pH 7,4 y que es una actividad oxalato oxidasa asociada con tejido sólido vegetal de hojas de *Bougainvillea spectabilis* (Biochem. J., 1962,

60

65

85, 33).

La presente invención también se refiere a oxalato oxidasas (o variantes de las mismas) con actividad suficiente aproximadamente a pH 7,5 así como a los polinucleótidos que codifican para las variantes. La invención también se refiere a una célula huésped recombinante que comprende los polinucleótidos así como a un método para producir las variantes de oxalato oxidasas. Especialmente, la invención se refiere a oxalato oxidasas recombinantes que tienen una actividad suficiente a pH 7,5, es decir pueden degradar oxalato a pH 7,4 de tal manera que la actividad relativa es de al menos el 20%. Se calcula la actividad relativa como (actividad observada (pH 7,5)/actividad máx.) * 100%. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de formiato a partir de oxalato en las condiciones descritas en el ejemplo 6 en el presente documento.

Tal como puede observarse a partir de los ejemplos en el presente documento, se han producido oxalato oxidasas recombinantes, que tienen una actividad relativa a pH 7,5 de al menos el 60%. En particular, se han producido oxalato oxidasas con una actividad relativa de al menos el 80% o al menos el 90%. Para ello, es importante observar que este hallazgo es único ya que no se ha dado a conocer ninguna oxalato oxidasa con tal actividad a pH 7,5 (intervalo de pH 7,0 - 8,0). La mayor parte de las oxalato oxidasas descritas tienen actividad máx. a pH ácido. Las oxalato oxidasas que tienen una actividad relativa adecuada a pH 7,5 o en el intervalo de pH 7,0 - 8,0 se basan todas en el hallazgo de oxalato oxidasas de material vegetal específico, en el que se halla sorprendentemente que las oxalato oxidasas tienen actividad a pH neutro/básico. Tal como puede observarse a partir de la tabla en los ejemplos, muchas plantas diferentes de una variedad de familias de plantas se han sometido a prueba y sólo unas pocas de ellas dieron un resultado positivo con respecto a la actividad a pH 7-8.

Una importante consecuencia de este hallazgo es la posibilidad de desarrollar una oxalato oxidasa recombinante terapéutica adecuada para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el exceso de oxalato tal como se describe en el presente documento. Especialmente el hallazgo abre camino a un enfoque novedoso, concretamente i) administración por vía parenteral (es decir, degradación de oxalato en el plasma/la sangre) o ii) administración por vía oral usando material con recubrimiento entérico y suministro de las enzimas recombinantes al intestino, en el que el pH es de aproximadamente 6-8, es decir a un pH en el que las oxalato oxidasas tienen una actividad adecuada.

La invención también se refiere al uso de variantes de oxalato oxidasa novedosas para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades relacionadas con oxalato y a composiciones que comprenden las variantes de oxalato oxidasa.

Pacientes con situaciones de oxalato graves. El oxalato en orina y plasma se origina a partir de dos fuentes: síntesis hepática y absorción de la dieta y se elimina principalmente por los riñones. En determinados estados patológicos, incluyendo hiperoxaluria primaria (HP) (1-4), hiperoxaluria secundaria (HS) (5-7), trastornos del espectro de Zellweger (TEZ) (8) e insuficiencia renal crónica (IRC) o insuficiencia renal en fase terminal (IRFT) (9-11), las concentraciones de oxalato en orina y oxalato en plasma pueden aumentar hasta concentraciones muy altas, que provocan graves enfermedades relacionadas con oxalato.

HP, incluyendo tipo I, II y III, son trastornos genéticos raros del metabolismo de glioxilato en los que deficiencias de enzimas hepáticas específicas dan como resultado la sobreproducción de oxalato en el hígado. El tipo I pertenece a la falta de alanina:glioxilato aminotransferasa (AGT) hepática y el tipo II a la falta de glioxilato/hidroxipiruvato reductasa (GR/HPR) (2). HP de tipo III resulta de defectos en la enzima mitocondrial específica del hígado 4-hidroxi-2-oxo-glutarato aldolasa (HOGA). Hay otro tipo de HP, denominado no I o no II, que muestra un fenotipo similar a HP, pero que tiene las enzimas mencionadas anteriormente representadas en el hígado (1). HP es la forma más grave de hiperoxaluria y los pacientes que presentan HP pueden producir oxalato en concentraciones en plasma mayores de 100 μ mol/l si han desarrollado insuficiencia renal crónica o en fase terminal (3, 9). La supersaturación de CaOx en la sangre de pacientes con HP conducirá a oxalosis sistémica: depositándose cristales de CaOx en múltiples órganos incluyendo los riñones, la tiroides, el miocardio, hueso, la piel, los vasos y ojos. La deposición de cristales de CaOx y las altas concentraciones de oxalato en los riñones conducirán en última instancia a IRFT y muerte si no se trata (12).

Los pacientes con TEZ tienen altas tasas de incidencia (83%) de hiperoxaluria (8). TEZ se caracteriza por una pérdida general de funciones peroxisómicas provocada por un ensamblaje peroxisómico deficiente. Aunque el mecanismo de síntesis de oxalato en los pacientes con TEZ está poco claro, los niveles de oxalato en orina en algunos pacientes con TEZ son comparables a los de pacientes con HP.

La hiperoxaluria secundaria (HS) está provocada por la sobreabsorción de oxalato o precursores de oxalato de la dieta o bien debido a enfermedades gastrointestinales (GI), tales como enfermedades inflamatorias del intestino (EII), fibrosis quística (FQ), síndrome del intestino corto y cirugía bariátrica, o ingestión de una dieta rica en oxalato o precursores de oxalato (6, 13, 14). HS es muy frecuente y generalmente menos grave que HP, pero las altas concentraciones de oxalato en orina y plasma pueden producirse en estos casos debido al consumo de dietas ricas en oxalato, grandes dosis ingeridas de vitamina C (un precursor de oxalato), o bien en pacientes con insuficiencia renal crónica o en fase terminal (6, 13, 14).

Es probable que los pacientes con IRC e IRFT sometidos a hemodiálisis crónica desarrollen hiperoxaluria (9-11). Los

riñones de estos pacientes en combinación con hemodiálisis no pueden eliminar oxalato suficientemente, debido a complicaciones de IRC o IRFT. Además, a menudo se inyecta vitamina C por vía intravenosa como antioxidante durante la hemodiálisis, que se metaboliza después para dar oxalato en el cuerpo humano (15). Las concentraciones de oxalato en plasma en estos pacientes pueden encontrarse entre 30-90 $\mu\text{mol/l}$. En 2006, hubo 345.000 pacientes sometidos a hemodiálisis en los Estados Unidos (16) y esta cifra está aumentando. Así, la cifra de pacientes con riesgo de oxalosis es significativa.

Efectos tóxicos de altas concentraciones de oxalato y CaOx. La supersaturación de CaOx en sangre puede conducir a oxalosis. Se han observado ampliamente cristales de CaOx depositados en múltiples órganos de pacientes con HP (2, 12) y cristales de CaOx depositados en órganos de pacientes con HS (15, 17-20) y también se ha notificado en pacientes que se someten a hemodiálisis crónica en muchos casos (11, 21-23). La deposición de cristales de CaOx en estos órganos puede dar como resultado disfunción orgánica. La oxalosis primaria y secundaria son a menudo uno de los factores críticos que afectan al desenlace de órganos trasplantados (11, 24-26). Muchos casos de disfunción de un trasplante están provocados por hiperoxaluria primaria o secundaria (18, 27).

Los pacientes que se someten a hemodiálisis crónica experimentan aterosclerosis acelerada y muerte prematura (28). Se propone el oxalato en plasma como toxina aterogénica debido a su contribución a los niveles elevados de calcio intracelular, exclusivamente en células endoteliales, y así a la prevención de la reendotelización.

Los efectos tóxicos más significativos de oxalato y CaOx son sus papeles en el desarrollo de IRC e IRFT (13, 14, 29-31). Los cristales de CaOx se depositan en los riñones de manera más frecuente que cualquier otro órgano. Se propone que los cristales de CaOx y/o altas concentraciones de oxalato evocan una respuesta inmunitaria e inducen daño tubulointersticial, que conduce a fibrosis, pérdida de nefronas, y eventualmente a IRC e IRFT. La deposición de CaOx en los riñones puede acelerar la formación y el crecimiento de cálculos renales. Debido a la capacidad de los cálculos de CaOx para obstruir y producir daño físico a los riñones, los cálculos renales también son un riesgo conocido para el desarrollo de insuficiencia renal (32).

Tratamientos actuales para situaciones de oxalato graves. Puesto que no existe actualmente ninguna cura para HP, se desarrollará IRFT y el trasplante de riñón o el trasplante combinado de hígado/riñón es la elección eventual (33).

Para pacientes con HS grave, es beneficioso limitar la ingesta en la dieta de oxalato y sus precursores. Sin embargo, si se ha desarrollado IRFT, la diálisis crónica y el trasplante de riñón serán las elecciones siguientes (27).

Para pacientes que presenta IRC o IRFT que se someten a diálisis crónica, se ha observado ampliamente la acumulación de oxalato en sangre debido a la capacidad limitada para eliminar oxalato mediante las técnicas de diálisis actuales. Además, la situación se empeora a menudo mediante la administración de grandes dosis de vitamina C, un antioxidante usado habitualmente para la hemodiálisis. Se ha encontrado la deposición de cristales de CaOx en órganos en muchos casos (11, 21-23) y la hiperoxaluria o formación de cálculos renales es muy frecuente entre estos pacientes (10).

Enzimas de degradación de oxalato. Existen dos enzimas de degradación de oxalato importantes: oxalato descarboxilasa y oxalato oxidasa (www.brenda-enzimas.org/). Sin embargo, no se han hallado oxalato descarboxilasas con actividad a pH fisiológico (pH 7,4) (www.brenda-enzimas.org/). Se ha notificado hojas de *Bougainvillea spectabilis* (Biochem. J., 1962, 85, 33) con cierta actividad oxalato oxidasa a pH 7,4. Sin embargo, no se detectó actividad oxalato oxidasa en disolución.

La presente invención se basa en examinar más de 1000 especies de plantas para detectar actividad oxalato oxidasa. Se recogieron los materiales vegetales en condiciones de crecimiento y categorías de clasificación significativamente diferentes.

Se analizó el material vegetal para detectar actividad oxalato oxidasa a pH 7,4 tal como se describe en el ejemplo 1 en el presente documento.

En aquellos casos en los que el material vegetal contenía oxalato oxidasa con una actividad de pH 7,4, se intentó obtener pequeñas cantidades de las enzimas. Estas oxalato oxidasas se asocian habitualmente con la pared celular y constituye un verdadero reto disolverlas. El procedimiento de purificación incluye la homogeneización de tejido vegetal para dar partículas de menos de 100 micrómetros, y la suspensión de las partículas en un tensioactivo que las contiene y alta concentración de sales o azúcar para extraer durante 2-5 días. El extracto en bruto se carga entonces en una columna de Q-Sepharose después de diálisis para retirar el tensioactivo y las sales. La enzima purificada parcialmente se carga entonces en SDS-PAGE o SDS-PAGE nativa. En la SDS-PAGE nativa, la enzima es todavía activa y puede teñirse con disolución de ensayo de actividad. La banda en SDS-PAGE puede recortarse y usarse el análisis de la secuencia de aminoácidos de segmentos peptídicos de la proteína mediante espectrometría de masas o usarse para análisis de aminoácidos N-terminales. Sólo se han purificado las oxalato oxidasas de plátano y remolacha dulce.

Especialmente, OxOx de cáscara de *Musa acuminata* (plátano), tallo de *Beta vulgaris* (remolacha), hojas de *Bougainvillea spectabilis*, hoja joven de *Mirabilis jalapa*, hoja de *Telosma cordatum* (Brum. f.) Merr, hoja de *Jatropha*

gossypifolia Linn. var. *elegans* Mueller y hoja de *Sauropus androgynus*(L.)Merr muestra actividad significativa a pH 7,5.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a oxalato oxidasas derivadas de material vegetal y que tienen una actividad suficiente (tal como se define en el presente documento) a pH 7,5. Más específicamente, la invención se refiere a una oxalato oxidasas recombinante que tiene una actividad suficiente a pH 7,5 (tal como se define en el presente documento) y que tiene secuencias de aminoácidos con una identidad de al menos el 60% con las oxalato oxidasas descritas en el presente documento, es decir SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o una identidad de secuencia de al menos el 99% con SEQ ID NO:8. En particular la identidad es de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 85%. Específicamente, la identidad es de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 100%.

15 El uso de oxalato oxidasas recombinantes con secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 60% con SEQ ID NO: 2, 4 ó 6, o una identidad de secuencia de al menos el 99% con SEQ ID NO: 8. y con aquellas oxalato oxidasas aisladas o que pueden aislarse de cáscara de *Musa acuminata* (plátano), tallo de *Beta vulgaris* (remolacha), hojas de *Bougainvillea spectabilis*, hoja joven de *Mirabilis jalapa*, hoja de *Telosma cordatum* (Brum. f.) Merr, hoja de *Jatropha gossypifolia* Linn. var. *elegans* Mueller y hoja de *Sauropus androgynus*(L.)Merr para el tratamiento o la profilaxis de enfermedad relacionada con oxalato es objeto de la presente invención.

20 Se ha notificado OxOx de cáscaras de plátano (Clinical Chemistry, 1985; 31(4): 649) y tallos de remolacha (Clinical Chemistry, 1983; 29(10):1815-1819) en la bibliografía, pero sin actividad alrededor de pH 7,4. Se sugiere que la OxOx notificada en la bibliografía puede ser diferente de las descritas en el presente documento. Tal como se demuestra en los ejemplos, se han aislado tres genes de OxOx (5100, 5102 y 5601) de remolacha dulce y todos tienen diferentes secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN, y muestran también diferentes propiedades. 5100 y 5102 muestran actividad muy alta (mayor del 80% de la actividad máxima) a pH 7,5, pero 5601 muestra solamente el 22% de la actividad máxima a pH 7,5. Por tanto, parece probable que ninguna de estas OxO sea la misma que las notificadas en la bibliografía. Aunque sólo se ha clonado un gen de OxOx de plátano en este trabajo, existen docenas de proteínas relacionadas con una similitud de más del 50% denominadas proteínas germinas o similares a germinas en una única planta (Critical Reviews in Plant Sciences, 2008; 27 (5): 342-375). Se ha notificado la presencia de una oxalato oxidasas de hojas de *Bougainvillea spectabilis* (Biochem. J.,1962, 85, 33) en la bibliografía. OxOx de las otras cuatro plantas se descubren por primera vez en este trabajo.

35 Por tanto, la presente invención se refiere a oxalato oxidasas o fragmentos o variantes de las mismas aislados de plátano, remolacha dulce, hoja joven de *Mirabilis jalapa*, hoja de *Telosma cordatum* (Brum. f.) Merr, hoja de *Jatropha gossypifolia* Linn. var. *elegans* Mueller y hoja de *Sauropus androgynus*(L.)Merr y que tienen una identidad de secuencia de al menos el 60% con SEQ ID NO: 2, 4 ó 6, o una identidad de secuencia de al menos el 99% con SEQ ID NO: 8.

40 Las secuencias de proteína de 5100, 5102, 5601 y 30640 se proporcionan en el ejemplo 2. 5100 y 5102 tienen 6 aminoácidos de diferente manera. 5102 comparte el 69% de identidades de aminoácidos con 5601. Las cuatro proteínas comparten solamente identidades del 37%. Tal como se muestra en el ejemplo 6, los perfiles de actividad de 5100 y 5102 de OxOx en el intervalo de pH de 4,5 a 8,0 son muy similares, mostrando alta actividad a pH 7,0-8,0. Sin embargo, el perfil de actividad de 5601 de OxOx del intervalo de pH de 4,5 a 8,0 es diferente de los de 5100 y 5102, pero similar al de 30640, mostrando poca actividad a pH neutro.

Polinucleótidos

50 La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican para las oxalato oxidasas según la invención, es decir oxalato oxidasas que tienen una actividad adecuada (tal como se define en el presente documento) a pH 7-8.

55 Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a un nucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico con una identidad de una identidad de secuencia de al menos el 60% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o al menos el 99% con SEQ ID NO: 7. En particular la identidad es de al menos 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 85%. Específicamente, la identidad es de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 100%.

60 Tal como se muestra en el ejemplo 2, los genes 5100 y 5102 tienen 8 nucleótidos de diferente manera. 5102 comparte el 69% de identidades con 5601. Los 4 genes comparten solamente identidades del 43%.

Constructos de ácido nucleico

65 La presente invención se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasas de la presente invención operativamente unida a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en un huésped adecuado en condiciones compatibles con la secuencia de control.

El polinucleótido puede manipularse en una variedad de modos para proporcionar la expresión de una oxalato oxidasa. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando ADN recombinante las conoce bien un experto en la técnica.

La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido reconocido por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa de la presente invención. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestra actividad transcripcional en la célula huésped incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse de genes que codifican para polipéptidos extracelulares o intracelulares o bien homólogos o bien heterólogos para la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula bacteriana son promotores obtenidos de bacterias, virus u otros, tales como Lac, Trp, Tac, T7, P_L o P_R.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica son promotores obtenidos de levaduras tales como AOX1, GAP.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de levadura son promotores obtenidos de levaduras tales como AOX1, GAP.

La secuencia de control también puede ser un terminador de la transcripción, que lo reconoce una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador de una operativamente al extremo 3'-terminal del polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa. Puede usarse cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped tal como TAA, TGA, TAG.

La secuencia de control también puede ser una secuencia líder de una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder se une operativamente al extremo 5'-terminal del polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa de la invención. Puede usarse cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped.

Ejemplos adecuados de secuencias líder pueden ser señal de secreción de factor de apareamiento alfa, PHO1, PHA-E, secuencia señal de alfa-amilasa (An-amyS), secuencia señal de glucoamilasa (Aa-GluS), secuencia señal de inulinasa (Km-InuS), secuencia señal de invertasa (Sc-InvS). Otros ejemplos son HFB1, HFB2, Scw, Dse, Exg, XPR2pre o Lip2prepro.

Vectores de expresión

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa de la presente invención, un promotor y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Las diversas secuencias de control y nucleótidos pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica para la oxalato oxidasa en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse insertando el polinucleótido en un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante está ubicada en el vector de modo que la secuencia codificante se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección de vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que va a introducirse el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

El vector puede contener uno o más marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia tanto biocida como viral, resistencia a metales pesados, y similares.

Marcadores adecuados pueden ser ampicilina, kanamicina o neomicina.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica para la oxalato oxidasa o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación/ubicaciones precisa(s) en el/los cromosoma(s).

Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que se

replique el vector de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite que se replique un plásmido o vector *in vivo*.

5 Ejemplos de orígenes de replicación adecuados para su uso en el presente contexto son pUC y p15A.

Más de una copia de polinucleótido de la presente invención puede insertarse en una célula huésped para aumentar la producción de oxalato oxidasa. Un aumento del número de copias del polinucleótido puede obtenerse integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido en el que pueden seleccionarse las células que contenían copias amplificadas del gen marcador seleccionable y de ese modo copias adicionales del polinucleótido, cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

15 Los procedimientos usados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención lo conoce bien un experto en la técnica.

Células huésped

20 La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa de la presente invención operativamente unida a una o más secuencias de control. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector se mantiene como integrante cromosómico o como vector extracromosómico de autorreplicación. El término "célula huésped" engloba cualquier progenie de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de la célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica para la oxalato oxidasa y su fuente.

La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una oxalato oxidasa, por ejemplo una procariota o una eucariota.

30 La célula huésped procariota puede ser una bacteria tal como *E.coli* o *Bacillus subtilis*

La célula huésped eucariota puede ser una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica. La célula fúngica puede ser una célula de levadura. Ejemplos adecuados son *Pichia pastoris X-33*, *GS115*, *Yarrowia lipolitica*, *Lactuca sativa L.*, *Pisum sativum* y *Nicotiana benthamiana*.

35

Métodos para producir oxalato oxidasas

40 La presente invención también se refiere a métodos de producción de oxalato oxidasas recombinantes de la presente invención, comprendiendo el método i) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones propicias para la producción de la oxalato oxidasa, y ii) opcionalmente recuperar la oxalato oxidasa.

Las células huésped se cultivan en un medio de nutrientes adecuado para la producción de la oxalato oxidasa usando un método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en placas de múltiples pocillos, cultivo en frascos de agitación o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, discontinua, semicontinua o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten que la oxalato oxidasa se exprese y/o aísle. El cultivo tiene lugar en un medio de nutrientes adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica.

50 Medios adecuados son: medios de cultivo a pequeña escala: LB+MnCl₂ 2 mM

Medios de fermentación a gran escala:

55 Medio base (por l): 13,5 g de KH₂PO₄, 0,85 g de ácido cítrico.H₂O, 10 g de polvo de levadura, 1 g de MgSO₄.7H₂O, 2,5 ml de disolución de metales traza, Antifoam 204: 400 microlitros, 1 ml de Amp. 100 mg/ml. Fijar el pH a 6,85 después de esterilización en autoclave. (la disolución de metales traza y Antifoam 204 se añaden después de esterilización en autoclave.)

60 Disolución de metales traza (por l):

0,5 ml de H₂SO₄, 25 mg de CuSO₄.5H₂O, 2,28 g de MnSO₄, 25 mg de Na₂MoO₄.2H₂O, 0,5 g de ZnSO₄.7H₂O, 45 mg de CoCl₂.6H₂O, 0,5 g de H₃BO₃, 3,25 g de CaCl₂.2H₂O, 5 g de FeSO₄.7H₂O.

65 Medio de alimentación (por l): 300 g de glicerol, 60 g de polvo de levadura.

La oxalato oxidasa puede detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para oxalato

oxidasas. Estos métodos de detección incluyen, pero no se limitan a ensayo colorimétrico, método de HPLC.

La oxalato oxidasa puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía, diálisis, técnicas de separación en gel, etc.

Usos

Tal como se mencionó en el presente documento anteriormente, puede usarse una enzima recombinante o un derivado adecuado de la misma según la invención en el tratamiento de enfermedades asociadas con la presencia de un exceso de oxalato (en comparación con los niveles normales). Se proporcionaron anteriormente ejemplos de tal enfermedad.

Composiciones de oxalato oxidasa

Se prevé que las oxalato oxidasas recombinantes tal cual o, si es necesario, en una forma que reduzca la posibilidad de reacciones inmunológicas no deseadas en un paciente, o que prolongue por ejemplo la semivida de la enzima en un líquido corporal tal como sangre o plasma. Un método general es someter la enzima a pegilación.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con oxalato en exceso, en la que la composición contiene una oxalato oxidasa recombinante o un derivado de la misma (por ejemplo, una oxalato oxidasa pegilada) que tiene una actividad adecuada a pH 7-8 (tal como se describió anteriormente).

Las composiciones pueden diseñarse para la administración oral, parenteral o mucosa. Por tanto, la administración puede ser oral, sublingual, aplicación a la mucosa oral, o puede ser intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratecal etc. o puede aplicarse a la piel o una superficie mucosa incluyendo mucosa ocular, bucal, nasal, vaginal y rectal.

La composición puede estar en forma sólida, semisólida o líquida.

Las composiciones sólidas adecuadas incluyen polvos, gránulos, microgránulos, cápsulas, comprimidos (incluidos comprimidos recubiertos), sobres, implantes, etc.

Las composiciones semisólidas adecuadas incluyen geles, pastas, cremas, pomadas, pesarios, supositorios, etc.

Las composiciones líquidas o fluidas adecuadas composiciones incluyen disoluciones, dispersión, emulsiones, suspensión, lociones, pulverizaciones, aerosoles.

Las composiciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación la enzima con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las composiciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto.

Tal como se mencionó anteriormente, la oxalato oxidasa recombinante puede administrarse por vía oral en forma de una formulación farmacéutica con recubrimiento entérico o una composición farmacéutica que se protegen mediante otros medios frente a la degradación de la enzima en el estómago. La formulación farmacéutica comprende la enzima recombinante en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y paciente que van a tratarse, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse en dosis variables.

Por ejemplo, las enzimas recombinantes de la invención pueden administrarse por vía oral, por vía bucal o por vía sublingual en forma de comprimido, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Para administración por vía oral, deben tomarse medidas para evitar la liberación o degradación de la enzima en el estómago.

Tal comprimido puede contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, lactosa o polietilenglicoles de alto

peso molecular. Para suspensiones y/o elixires acuosos, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

5 Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Puede prepararse un comprimido sometido a compresión mediante la compresión en una máquina adecuada de un principio activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (por ejemplo povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Puede producirse un comprimido moldeado mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto pulverulento humedecido con un diluyente líquido inerte. El comprimido puede recubrirse opcionalmente, por ejemplo, con un recubrimiento entérico y puede formularse de modo que se proporcione la liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado.

10 Las composiciones para su uso según la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como disolución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como emulsión líquida de aceite en agua o como emulsión líquida de agua en aceite.

15 Debe entenderse que además de los componentes mencionados particularmente antes, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo las adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

20 Ventajosamente, los agentes tales como conservantes y agentes tamponantes pueden disolverse en el vehículo. Para mejorar la estabilidad, la composición puede congelarse después de llenarse en el vial y eliminarse el agua a vacío. El polvo liofilizado seco se sella entonces en el vial y puede suministrarse un vial acompañante de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso.

25 La composición también puede diseñarse para administración parenteral. Tales composiciones pueden contener excipientes, que son farmacéuticamente aceptables para una composición que va a inyectarse. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato, cloruro de sodio) o composiciones secas, especialmente secadas por congelación, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, se reconstituyen para dar una composición lista para usar.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles. Las composiciones pueden incluir disolventes como agua o etanol, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o similar, glicerol o propilenglicol. Puede añadirse un agente de ajuste del pH para ajustar el pH de la composición y también pueden añadirse conservantes.

35 Un experto en la técnica podrá preparar una composición que es adecuada para su uso según la presente invención basándose en la divulgación del presente documento y/o con la orientación de Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Publishing Company, 1990 o ediciones más recientes.

40 La dosificación que ha de administrarse de una oxalato oxidasa variará según la enfermedad particular implicada, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, y la vía de administración seleccionada.

45 La dosificación apropiada puede determinarla fácilmente un experto en la técnica.

50 Las composiciones pueden contener desde el 0,1% en peso, preferiblemente desde el 5-90%, más preferiblemente desde el 10-80% en peso, de una oxalato oxidasa de invención, dependiendo de la composición y el método de administración particulares.

55 Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y separación óptimas de dosificaciones individuales de un compuesto de la invención estarán determinadas por la naturaleza y extensión del estado que esté tratándose, la forma, vía y el sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto particular que esté tratándose, y que un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas que han de usarse. Esta dosificación puede repetirse de manera tan frecuente como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios la cantidad y/o frecuencia de la dosificación puede alterarse o reducirse, según la práctica clínica normal.

Definiciones

65 **ADNc:** El término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa de una molécula de ARNm madura, sometida a corte y empalme obtenida de una célula. El ADNc carece de secuencias intrónicas que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN

primario, inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, incluyendo corte y empalme, antes de aparecer como ARNm maduro sometido a corte y empalme.

5 Secuencia codificante: El término “secuencia codificante” significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de la enzima o variante de la enzima. Los límites de la secuencia codificante están determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de iniciación tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

10 Secuencias de control: El término “secuencias de control” significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa o variante de la presente invención. Cada secuencia de control debe ser nativa (es decir, procedente del mismo gen) o foránea (es decir, procedente de un gen diferente) para el polinucleótido que codifica para la oxalato oxidasa o variante de la misma o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen un promotor, y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de control pueden estar dotadas de ligadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan el ligamiento de la secuencia de control con la región codificante del polinucleótido que codifica para la oxalato oxidasa o variante de la misma.

15 Expresión: El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción de una oxalato oxidasa o variante de la misma incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

20 Vector de expresión: El término “vector de expresión” significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica para una oxalato oxidasa o variante de la misma y está operativamente unida a secuencias de control que proporcionan su expresión.

25 Fragmento: El término “fragmento” significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo-terminal del polipéptido del mismo, en el que el fragmento tiene actividad oxalato oxidasa. El fragmento puede tener al menos el 85% de los residuos de aminoácido, por ejemplo al menos el 90% o al menos el 95% de los residuos de aminoácido del polipéptido maduro.

30 Célula huésped: El término “célula huésped” significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, o similar, con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido tal como se describe en el presente documento.

35 Aislado: El término “aislado” significa una sustancia en una forma o un entorno que no se produce en la naturaleza. Los ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen i) cualquier sustancia que se produce de manera no natural, ii) cualquier sustancia incluyendo, pero sin limitarse a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se retira al menos parcialmente de uno o más o la totalidad de los constituyentes que se producen de manera natural con los que está asociado en la naturaleza, iii) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con relación a aquella sustancia que se encuentra en la naturaleza, o iv) cualquier sustancia modificada aumentando la cantidad de la sustancia con relación a otros componentes con los que se asocia de manera natural.

40 Mutante: El término “mutante” significa un polinucleótido que codifica para una variante.

45 Constructo de ácido nucleico: El término “constructo de ácido nucleico” significa una molécula de ácido nucleico, o bien monocatenaria o bien bicatenaria, que se aísla de un gen que se produce de manera natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría si no en la naturaleza o que es sintético, que comprende una o más secuencias de control.

50 Operativamente unida: El término “operativamente unida” significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con relación a la secuencia codificante de un polinucleótido, de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

55 pH óptimo: El término “pH óptimo” significa el valor de pH en el que la actividad enzimática está en su nivel máximo o al menos al 80%, por ejemplo al 85%, al 90%, al 95% o al 98% de su nivel máximo.

60 Enfermedad relacionada con oxalato: El término “enfermedad relacionada con oxalato” significa una enfermedad o un estado provocado por un exceso de oxalato en el cuerpo en comparación con el nivel normal. Tal enfermedad o estado incluyen, pero no se limitan a, hiperoxaluria primaria (HP), hiperoxaluria secundaria (HS), trastorno del espectro de Zellweger (TEZ) e insuficiencia renal crónica o insuficiencia renal en fase terminal (IRFT), autismo, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis, urolitiasis, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, sarcoidosis, asma, EPOC, fibromialgia, síndrome de Zellweger, cirugía bariátrica y otros estados patológicos entéricos.

Identidad de secuencia: El término “identidad de secuencia” significa la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Se usó el algoritmo Blast. Se proporciona por pubmed.gov, es decir, el Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

5 Actividad específica: El término “actividad específica se refiere a las actividades enzimáticas por mg de proteína.

Unidad: una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de formiato a partir de oxalato en las condiciones descritas en el ejemplo 6 en el presente documento.

10 Variante: El término “variante” significa un polipéptido que tiene actividad oxalato oxidasa que comprende una alteración, es decir una sustitución, inserción y/o delección, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una delección significa la retirada de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir un aminoácido adyacente a e inmediatamente tras el aminoácido que ocupa la posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos el 20%, por ejemplo al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o el 100% de la actividad oxalato oxidasa de la oxalato oxidasa parental.

Leyendas de las figuras

20 Figura 1. Modificaciones del vector pET-32 para generar el plásmido pAT. La secuencia de ADN destacada en amarillo se delecionó en un vector pET-32 (SEQ ID NO. 23) para generar el plásmido pAT (SEQ ID NO. 24).

25 Figura 2 Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia Z α -5102*.

Figura 3 Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia GAPZ α -5102*.

Figura 4 Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia Z α -5601*.

30 Figura 5 Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia GAPZ α -5601*.

Figura 6 Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia Z α -30640*.

35 Figura 7 Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia GAPZ α -5102*.

Figura 8 Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de OxO de remolacha en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; M: marcador de proteína; carriles 1-10, X-33 (Z α A-5102).

40 Figura 9 Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de OxO de remolacha en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; carriles 1-9, X-33(Z α -5601).

Figura 10 Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de platano OxO en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; carriles 1-10, X- 33(Z α A-30640).

45 Figura 11 Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de OxO de remolacha en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; carriles 1-9, X-33(GAPZ α - 5601).

Figura 12 Amplificación por PCR de los genes de OxO de la biblioteca de ADNc de remolacha azucarera. M. marcador de ADN; carriles 1-4, 5601; carriles 5-8, 5102

50 Figura 13 Amplificación por PCR del gen de OxO de la biblioteca de ADNc de plátano. M. marcador de ADN; carriles 1-3, 30640

55 Figura 14 Diagrama esquemático del vector de expresión vegetal

Figura 15 Ensayo histoquímico de la actividad oxalato oxidasa después de incubación durante la noche en tampón histológico de OxOx

60 Figura 16 Detección de actividad OxO de la fracción de pared celular purificada de plantas de guisante mediante ensayo colorimétrico, pH 7,4. El tubo izquierdo contenía ácido oxálico 2 mM; el tubo derecho no contenía ácido oxálico.

Figura 17 Detección de actividad OxOx de las fracciones de 5102 purificadas de plantas de guisante.

65 Figura 18 Purificación de 5102 de OxOx de remolacha recombinante. M, marcador de proteína; carril 1, muestra antes de purificarse mediante columna de Q Sepharose; carril 2, la muestra de lavado; carril 3, muestra eluida n.^o 13;

carril 4, muestra eluida n.º 14; carril 5, muestra eluida n.º 15.

Figura 19 Actividad relativa de oxalato oxidasas recombinantes.

5 Figura 21 Curva de concentración de oxalato en suero del ejemplo 12.

Figura 22 Curva de oxalato en orina total de 24 h del ejemplo 12.

Figura 23 Detección de título de anticuerpos de OxOx-B5102 de diferentes PEG-OxOx-B5102 del ejemplo 12.

10

Bibliografía

1. Monico, C. G., Persson, M., Ford, G. C., Rumsby, G., and Milliner, D. S. (2002) Potential mechanisms of marked hyperoxaluria not due to primary hyperoxaluria I or II, *Kidney Int* 62, 392-400.
2. Hoppe, B., Beck, B. B., and Milliner, D. S. (2009) The primary hyperoxalurias, *Kidney Int* 75, 1264-1271.
3. Hoppe, B., Kemper, M. J., Bokenkamp, A., Portale, A. A., Cohn, R. A., and Langman, C. B. (1999) Plasma calcium oxalate supersaturation in children with primary hyperoxaluria and end-stage renal failure, *Kidney Int* 56, 268-274.

4. Hoppe, B., Kemper, M. J., Bokenkamp, A., and Langman, C. B. (1998) Plasma calcium-oxalate saturation in children with renal insufficiency and in children with primary hyperoxaluria, *Kidney Int* 54, 921-925.
5. Mydlik, M., and Derzsiova, K. (2008) Oxalic Acid as a uremic toxin, *J Ren Nutr* 18, 33-39.
6. Bernhardt, W. M., Schefold, J. C., Weichert, W., Rudolph, B., Frei, U., Groneberg, D. A., and Schindler, R. (2006) Amelioration of anemia after kidney transplantation in severe secondary oxalosis, *Clin Nephrol* 65, 216-221.
7. Marangella, M., Vitale, C., Petrarulo, M., and Linari, F. (1995) The clinical significance of assessment of serum calcium oxalate saturation in the hyperoxaluria syndromes, *Nephrol Dial Transplant* 10 Suppl 8, 11-13.
8. van Woerden, C. S., Groothoff, J. W., Wijburg, F. A., Duran, M., Wanders, R. J., Barth, P. G., and Poll-The, B. T. (2006) High incidence of hyperoxaluria in generalized peroxisomal disorders, *Mol Genet Metab* 88, 346-350.
9. Ogawa, Y., Machida, N., Ogawa, T., Oda, M., Hokama, S., Chinen, Y., Uchida, A., Morozumi, M., Sugaya, K., Motoyoshi, Y., and Hattori, M. (2006) Calcium oxalate saturation in dialysis patients with and without primary hyperoxaluria, *Urol Res* 34, 12-16.
10. Canavese, C., Petrarulo, M., Massarenti, P., Berutti, S., Fenoglio, R., Pauletto, D., Lanfranco, G., Bergamo, D., Sandri, L., and Marangella, M. (2005) Long-term, low-dose, intravenous vitamin C leads to plasma calcium oxalate supersaturation in hemodialysis patients, *Am J Kidney Dis* 45, 540-549.
11. Maldonado, I., Prasad, V., and Reginato, A. J. (2002) Oxalate crystal deposition disease, *Curr Rheumatol Rep* 4, 257-264.
12. Cochat, P., Liutkus, A., Fargue, S., Basmaison, O., Ranchin, B., and Rolland, M. O. (2006) Primary hyperoxaluria type 1: still challenging!, *Pediatr Nephrol* 21, 1075-1081.
13. Tintillier, M., Pochet, J. M., Blackburn, D., Delgrange, E., and Donckier, J. E. (2001) Hyperoxaluria: an underestimated cause of rapidly progressive renal failure, *Acta Clin Belg* 56, 360-363.
14. Nasr, S. H., D'Agati, V. D., Said, S. M., Stokes, M. B., Largoza, M. V., Radhakrishnan, J., and Markowitz, G. S. (2008) Oxalate nephropathy complicating Roux-en-Y Gastric Bypass: an underrecognized cause of irreversible renal failure, *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 1676-1683.
15. Nasr, S. H., Kashtanova, Y., Levchuk, V., and Markowitz, G. S. (2006) Secondary oxalosis due to excess vitamin C intake, *Kidney Int* 70, 1672.

16. (2008) USRDS 2008 Annual Data Report., in *United States Renal Data System Web site*. www.usrds.org/adr.htm.
17. Cornelis, T., Bammens, B., Lerut, E., Cosyn, L., Goovaerts, G., Westhovens, R., and Vanrenterghem, Y. (2008) AA amyloidosis due to chronic oxalate arthritis and vasculitis in a patient with secondary oxalosis after jejunioileal bypass surgery, *Nephrol Dial Transplant* 23, 3362-3364.
18. Rankin, A. C., Walsh, S. B., Summers, S. A., Owen, M. P., and Mansell, M. A. (2008) Acute oxalate nephropathy causing late renal transplant dysfunction due to enteric hyperoxaluria, *Am J Transplant* 8, 1755-1758.
19. Sule, N., Yakupoglu, U., Shen, S. S., Krishnan, B., Yang, G., Lerner, S., Sheikh-Hamad, D., and Truong, L. D. (2005) Calcium oxalate deposition in renal cell carcinoma associated with acquired cystic kidney disease: a comprehensive study, *Am J Surg Pathol* 29, 443-451.
20. Lefaucheur, C., Nochy, D., Amrein, C., Chevalier, P., Guillemain, R., Cherif, M., Jacquot, C., Glotz, D., and Hill, G. S. (2008) Renal histopathological lesions after lung transplantation in patients with cystic fibrosis, *Am J Transplant* 8, 1901-1910.
21. Nakazawa, R., Hamaguchi, K., Hosaka, E., Shishido, H., and Yokoyama, T. (1995) Cutaneous oxalate deposition in a hemodialysis patient, *Am J Kidney Dis* 25, 492-497.
22. Ono, K., and Kikawa, K. (1989) Factors contributing to oxalate deposits in the myocardia of hemodialysis patients, *ASAIO Trans* 35, 595-597.
23. Ohtake, N., Uchiyama, H., Furue, M., and Tamaki, K. (1994) Secondary cutaneous oxalosis: cutaneous deposition of calcium oxalate dihydrate after long-term hemodialysis, *J Am Acad Dermatol* 31, 368-372.
24. Perera, M. T., McKiernan, P. J., Sharif, K., Milford, D. V., Lloyd, C., Mayer, D. A., Kelly, D. A., and Mirza, D. F. (2009) Renal function recovery in children undergoing combined liver kidney transplants, *Transplantation* 87, 1584-1589.
25. Alsuwaida, A., Hayat, A., and Alwakeel, J. S. (2007) Oxalosis presenting as early renal allograft failure, *Saudi J Kidney Dis Transpl* 18, 253-256.
26. Truong, L. D., Yakupoglu, U., Feig, D., Hicks, J., Cartwright, J., Sheikh-Hamad, D., and Suki, W. N. (2004) Calcium oxalate deposition in renal allografts: morphologic spectrum and clinical implications, *Am J Transplant* 4, 1338-1344.
27. Cuvelier, C., Goffin, E., Cosyns, J. P., Wauthier, M., and de Strihou, C. Y. (2002) Enteric hyperoxaluria: a hidden cause of early renal graft failure in two successive transplants: spontaneous late graft recovery, *Am J Kidney Dis* 40, E3.

28. Recht, P. A., Tepedino, G. J., Siecke, N. W., Buckley, M. T., Mandeville, J. T., Maxfield, F. R., and Levin, R. I. (2004) Oxalic acid alters intracellular calcium in endothelial cells, *Atherosclerosis* 173, 321-328.
29. Khan, S. R. (2004) Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies, *Clin Exp Nephrol* 8, 75-88.
30. Umekawa, T., Iguchi, M., Uemura, H., and Khan, S. R. (2006) Oxalate ions and calcium oxalate crystal-induced up-regulation of osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1 in renal fibroblasts, *BJU Int* 98, 656-660.
31. Dell'Aquila, R., Feriani, M., Mascalonzi, E., Bragantini, L., Ronco, C., and La Greca, G. (1992) Oxalate removal by differing dialysis techniques, *ASAIO J* 38, 797-800.
32. Gambaro, G., Favaro, S., and D'Angelo, A. (2001) Risk for renal failure in nephrolithiasis, *Am J Kidney Dis* 37, 233-243.
33. Brinkert, F., Ganschow, R., Helmke, K., Harps, E., Fischer, L., Nashan, B., Hoppe, B., Kulke, S., Muller-Wiefel, D. E., and Kemper, M. J. (2009) Transplantation procedures in children with primary hyperoxaluria type 1: outcome and longitudinal growth, *Transplantation* 87, 1415-1421.

Ejemplos

5

Cepas y plantas

E.coli BL21(DE3), *E.coli* Origami B(DE3), *P. pastoris*, plantas de *N. benthamiana* de tipo natural, plantas de *P. sativum*.

10

Ejemplo 1

Examen de plantas y pruebas para determinar la actividad de oxalato oxidasa

15

Recogida de especies vegetales: se recogieron más de 1000 especies vegetales para someter a prueba. A continuación se presenta una lista de las plantas que se han sometido a prueba.

Vitis vinifera	Lanrus nobilis Linn
Fragaria ananassa Duchesne	Parakmeria Latungensis
Eriobotrya japonica	Parakmeria Yunnanensis
Coriandrum sativum L.	Eucommia ulmoides Oliver
Chrysanthemum coronarium	Loropetalum chinensis (R. Br.) Oliv
Brassica rapa chinensis	Celtis sinensis Pers
Brassica rapa pekinensis	Tulipa gesneriana
Brassica campestris pekinensis	Sinojackia xylocarpa Hu
Brassica pekinensis	Osmanthus armatus Diels
Lactuca sativa	Malus hupehensis(Pamp.)Rehd
Vicia faba Linn	Sloanea hemsleyana ligustrum japonicum
Pisum sativum Linn	Thunb.var rvtundifolium B1

ES 2 694 667 T3

Solanum tuberosum L	Pittosporum tobira
Solanum tuberosum L	Acer palmatum
Colocasia esculenta	E.pungens Thunb
Lactuca sativa L. var. capitata L.	Prunus ceraifera
Bamboo Shoot	Taiwania cryptomerioides Hayata
Brassica parachinensis	Chaenomeles sinensis Koehne
Toona sinensis.A.Juss.	Taxus wallichiana Zucc
Pisum sativum Linn	Ormosia henryi Prain
Allium sativum L.	Pyracantha fortuneana
Apium graveolens L.	Mallotus repandus (Willd.) Muell. Arg
Hordeum vulgare L.	Distylium racemosum Sieb.et Zucc
Hordeum vulgare L.	Viburnum setigerum Hance
Hordeum vulgare L.	Jasminum mesnyi
Cruciferae Brassica	Chimonanthus praecox(L.)Link
Allium epa L.	Hovenia acerba Lindl.
Alliaceae Allium A. tuberosum	Mahonia fortunei (Lindl.)Fedde
Dioscorea opposita	Cercis chinensis Bge
Vigna radiata	Chionanthus retusus
Momordica charantia	Fraxinus hupehensis
Cucumis sativus Linn	Alpinia zerumbet
Benincasa hispida	Asparagus myriocladus
Ananas comosus	Cerasus conradinae (Koehne) Yü et Li
Ananas comosus	Juniperus chinensis cv. kaizuka
Prunus ceraifera cv. Pissardii	Brunfelsia acuminata(Pohl.)Benth
Alliaceae Allium A. tuberosum	Bambusa ventricosa McClure
Pisum sativum Linn	Hedera nepalensis
Benincasa hispida	Dendrobeaathamia capitata(Wall.)
Benincasa hispida	Hutoh.var.emeiensis (Fang et Hsieh) Fang et.W.K.Hu
Vigna radiata	Cyperus papyrus L.
Cruciferae Brassica	Pilea nummulariifolia (Sw.) Wedd.
Momordica charantia	Syngonium podophyllum
Ananas comosus	:Iresine herbstii Hook.f
Alliaceae Allium A. tuberosum	Simlax China L
Alliaceae Allium A. tuberosum	Gleditsia japonica
Benincasa hispida	Euonymus grandiflorus Wall.
Vigna radiata	Planch.cv.Fenghongpeier
Giyicine max(L)Merrill	Ilex cornuta Lindl. et Paxt.
Eleocharis dulcis	Berchemia sinica Scheid
Alliaceae Allium A. tuberosum	Symplocos sununtia Buch.-Ham.ex.D.Don
Sorghum bicolor	Dianthus chinensis L.
Brassic campestris	Olea europaea L
Galium aparine	Begonia masoniana

ES 2 694 667 T3

Geranium carolinianumL.	Marsilea quadrifolia
Euphorbia helioscopia	Hibiscus rosa-sinensis L.
Portulaca oleracea L.	Dracaena cochinchinen
Oxalis corniculata	Common Rush
Vicia sepium linn.	Manilkara zapota van Royen
Eugenia javanica Lam [hojas]	Ligustrum lucidum Ait
Eugenia javanica Lam [fruta]	Begonia thurstonin
Reineckea carnea	Nephrolepis biserrata (Sw.) Schott
Bougainvillea spectabilis wind	Quisqualis indica
Bougainvillea spectabilis wind	Asystasia gangetica
Sinojackta huanamelensis	Podocarpus macrophyllus
Neolitsea sericea	Artabotrys hexapetalus (L.f.) Bhandari
Heptacodium Miconiodes rehd	Telosma cordatum (Brum. f.) Merr
banana	Forsythia viridissima
Populus bonatii Levl	Osmanthus matsumuranus Hayata
Vitis vinifera	Phoebe zhennan S.Lee et F.N.Wei
Prunus armeniaca L.	Davidia involucrata Baill
Mirabilis jalapa Linn	Neolepisorus ovatus
Mirabilis jalapa Linn	Setcreasea pallida
Gordonia axillaris	Clerodendron japonicum (Thunb.) Sweet
Lindera aggregata (Sims) Kosterm	Hydrangea macrophylla (Thunb.)Ser
Lllicium henryi	Psidium littorale Raddi
PhoebechekiangensisC.B.Shang	Savia miltiorrhiza Bunge
Fokienia hodginsii (Dunn) Henry et Thomas	Fagraea ceilanica
Viburnum macrocephalum f.keteleeri	Paeonia suffruticosa""
Zanthoxylum simullans Hance	Sycopsis sinensis Oliver
Cinnamomum camphora	Aesculus wilsonii Rehd
Acer alboburpurascens Hayata	Edyeworthia chrysantha Lindl
Daphniphyllum macropodum Miq	Pilea peperomioides Diels
Camellia sasanqua	Helleborus thibetanus Franch.
Sinocalycanthus chinensis	Euonymus fortunei Hand.-Mazz.
Bulbus Fritillaria	Dicliptera chinensis
Costus tonkinensis Gagnep	Stevia rebaudiana
Disporum bodinieri (Levl. et Vaniot.)	Rhizoma Alpiniae Officinarum
Podocarpus fleuryi	Asarum forbesii Maxim
Tetracentron sinense	Sarcandra glabra
Reinwardtia trigyna	Peristrophe baphica
Valeriana hardwickii	Peperomia tetraphylla
Fagopyrum dibotrys (D.Don) Hara	Erythrina crista-galli L
Thalia dealbata	Rumex japonicus Houtt
Muscari botryoides Mill.	Melodinus hemsleyanus Diels.
Fagus longipetiolata Seem	Tibouchina aspera

ES 2 694 667 T3

Jussiaea repens L.	Rumex hastatus
Podocarpus fleuryi	Hibiscus Sabdariffa Linn
Ardisia crenata Sim	Catharanthus roseus
Torreya fargesii Franch	Tragopogon porrifolius Linn
Aesculus wangii Hu ex Fang	Mussaenda pubescens Ait. f.
Nerium oleander	Sedum sarmentosum Bunge
Strobilanthes cusia	Pilea cavaleriei Levl
Drynaria fortunei	Sauropus rostrata Miq
Belamcanda chinensis	Acorus gramineus
Kalimeris indica (Linn.) Sch.)	Euphorbia neriifolia L.
Rhoeo discolor	Euphorbia tirucalli Linn
Fiveleaf Gynostemma Herb	Dianthus serotinus
Sterculia nobililis	Codariocalyx motorius
Choerospondias axillaris	Acalypha hispida
Citrus medica L.var.sarcodactylis	Acalypha hispida
Gynostemma compressum	Garcinia oblongifolia
Chrysanthemum indicum	Cynanchum stauntonii
SpilsheS acmella (Linn) Murr	Aloe vera var. chinensis
Ilex kudmcha C. J. Tseng	Polygonum capitatum
Cinnamomum cassia	Iris japonica
Rumex crispus L. var. japonicus	Acanthopanax gracilistylus
Clerodendranthus spicatus (Thunb.)	Dicranostigma leptopodium
Glechoma longituba	Iris wilsonii
HymenocallisSpcosa	Solanum mammosum Linn.
Agrimonia pilosa Ledeb	Rheum officinale
Dimocarpus longgana Lour.	Rabdosia nervosa (Hemsl.)
Lxora chinensis	Plumbago zeylanica L
Rhapis excelsa (Thunb.)	Desmodium styracifolium
Eranthemum pulchellum Andrews	Salvia substolonifera Stib.
Hypericum perforatum L	Aspidistra elatior Bl.
Hippeastrum rutilum(Ker-Gawl.)Herb.	Achyranthes bidentata Bl
Pogonatherum crinitum (Thunb.) Kunth	Achyranthes bidentata Bl
Echinacea purpurea Moench	Pandanus tectorius
Pseudocalymma alliaceum(Lam.)Sandwith	Lygodium scandens (L.) Sw.
Sanguisorba officinalis L.	Asparagus cochinchinensis
desmodium triquetrum	Lonicera dasystyla
Rabdosia japonica (Burm. f.) Hara	Zanthoxylum nitidum
Tadehagi pseudotriquetrum (DC.)	Billbergia pyramidalis
Houttuynia cordata Thunb.	Ficus sarmentosa
Gynura procumbens (Lour.) Merr.	Pyrrosia drakeana
Vinca major Linn	Ardisia pusilla A. DC.
Zephyranthes carinata Herb	Boehmeria nivea

ES 2 694 667 T3

<i>Platycodon grandiflorus</i>	<i>Artemisia japonica</i> Thunb
<i>Aquilaria sinensis</i>	<i>Forsythia suspensa</i>
<i>Salvia cavaleriei</i>	<i>Ardisia gigantifolia</i> stapf
<i>Datura innoxia</i> Mill.	<i>Tacca chantrieri</i> Andre
<i>Codariocalyx gyroides</i>	<i>Morinda officinalis</i> How.
<i>Aerva sanguinolenta</i>	<i>Ardisia villosa</i>
<i>Aster novi-belgii</i>	<i>Hemerocallis citrina</i> Baroni
<i>Colocasia antiquorum</i> Schott	<i>Goodyera procera</i>
<i>Heteropanax fragrans</i>	<i>Fallopia multiflora</i>
<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl.	<i>Campsis radicans</i> (L.) Seem.
<i>Iris germanica</i>	<i>Piper longum</i> Linn.
<i>Alocasia macrorrhiza</i>	<i>Passiflora edulis</i>
<i>Gelsemium elegans</i>	<i>Prunella vulgaris</i>
<i>Cocculus laurifolius</i> DC.	<i>Jasminum nudiflorum</i>
<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Kadsura longipedunculata</i>
<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	<i>Mentha haplocalyx</i>
<i>Buddleja asiatica</i> Lour.	<i>Evodia lepta</i> (Spreng.) Merr
<i>Buddleja davidii</i>	<i>Acacia confusa</i> Merr
<i>Caesalpinia decapetala</i>	<i>Stephania kwangsiensis</i>
<i>Jatropha gossypifolia</i>	<i>Tetrastigma hemsleyanum</i>
<i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn	<i>Herba Cayratia Japonicae</i>
<i>Carpesium abrotanoides</i> Linn.	<i>Asarum maximum</i> Hemsl.
<i>Euphorbia heberophylla</i> L	<i>Argyreia acuta</i> Lour.
<i>Coleus amboinicus</i> Lour	<i>Solallum nigrum</i> L.ver
<i>Lycoris aurea</i>	<i>Curculigo capitulata</i>
<i>Sauropus androgynus</i> (L.)Merr	<i>Fructus Amomi</i>
<i>Houttuynia emeiensis</i>	<i>Polygonum chinense</i> L.
<i>Sophora flavescens</i>	<i>Rosa chinensis</i>
<i>Salvia coccinea</i> Linn	<i>selaginella moellendorffii</i> hieron
a plant in Tadehagi	<i>Herba Aristolochiae</i>
<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz	<i>Rubus cochinchinensis</i> Tratt
<i>Ardisia japonica</i> (Thunb) Blume	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.
<i>Trachelospermum jasminoides</i>	<i>Rhododendron pulchrum</i> Sweet
<i>Wisteria sinensis</i>	<i>Dichotomanthus tristaniaecarpa</i> Kurz
<i>Duchesnea indica</i>	<i>Cyclobalanopsis glaucoides</i> Schotky
<i>Ajuga decumbens</i> Thunb	<i>Rhododendron anthopogonoides</i> Maxim
<i>Potentilla kleiniana</i>	<i>Malus halliana</i> (Voss.) Koehne
<i>Pteris semipinnata</i> L.	<i>Pistacia weinmannifolia</i>
<i>Senecio cannabifolius</i> Less	<i>Ginkgo biloba</i>
<i>Ophitopogon japonicum</i>	<i>Melaleuca bracteata</i>
<i>Polygonum hydropiper</i> L.	<i>Rhododendron fuyuanense</i> Z. H. Yang
<i>Pueraria lobata</i>	<i>Ligustrumx Vicaryi</i>

ES 2 694 667 T3

<i>Mentha spicata</i> Linn.	<i>Euonymus Japonicus</i>
<i>Lonicera fulvotomentosa</i>	<i>Cerasus cerasoides</i>
<i>Acacia confusa</i> Merr	<i>Rhododendron 'nanhai'</i>
<i>Erythralum scandens</i> Bl.	<i>Rhododendron 'suimohua'</i>
<i>Caryota mitis</i> Lour.	<i>Rhododendron delavayi</i> Franch
<i>Cirsium segetum</i>	<i>Exochorda racemosa</i> (Lindl.) Rehd
<i>Curcuma kwangsiensis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Artemisia argyi</i>	<i>Cotoneaster franchetii</i>
<i>Limnophila sessiliflora</i>	<i>Prunus serrulata</i>
<i>Alpinia katsumadai</i> Hayata	<i>Pinus armandii</i> Franch
<i>Blumea balsamifera</i> DC	<i>Pittosporum brevicalyx</i> (Oliv.) Gagnep
<i>Ficus pumila</i> L	<i>Osyris wightiana</i> Wall. ex Wight
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	<i>Rhododendron 'mayingtao'</i>
<i>Agastache rugosa</i>	<i>Rhododendron hancockii</i> Hemsl.
<i>Polygonum chinense</i> L	<i>Rhododendron cilicalyx</i> Franch.
<i>Jasminum amplexicaule</i>	<i>Amygdalus persica</i>
<i>Gnetum montanum</i> Markgr	<i>Abelia parvifolia</i> Hemsl.
<i>Rhododendron pachypodum</i>	<i>Lonicera nitida 'Baggesens'</i>
<i>Parakmeria yunnanensis</i>	<i>Rhododendron schlippenbachii</i>
<i>Sinocalycanthus chinensis</i>	<i>Amygdalus persica f. atropurpurea</i>
<i>Cerasus campanulata</i>	<i>Pyracantha fortuneana</i>
<i>Quercus variabilis</i> Blume	<i>Trigonobalanus verticillata</i>
<i>Rhododendron 'Wanxia'</i>	<i>Rhododendron 'kunming'</i>
<i>Spiraea japonica</i> L. f.	<i>Acer cappadocicum</i>
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	<i>Rhododendron mucronatum</i>
<i>Hovenia acerba</i>	<i>Rhododendron 'fenpao'</i>
<i>Rhododendron fortunei</i>	<i>Dianthus plumarius</i>
<i>Rhododendron leptothrium</i>	<i>Musella lasiocarpa</i>
<i>magnolia grandiflora</i> linn	<i>Rhododendron irroratum</i> Franch
<i>Rhododendron pachypodum</i>	<i>Pistacia chinensis</i>
<i>Barleria cristata</i>	<i>Hovenia acerba</i> Lindl.
<i>Vitex negundo</i> Linn	<i>Michelia lacei</i> W. W. Smith
<i>Viburnum opulus</i> L	<i>Distylium pingpienense</i> (Hu) Walk.
<i>Spiraea japonica</i> L. f.	<i>Sedum Nicaeense</i> All.
<i>Cotoneaster salicifolius</i>	<i>Aglaia odorata</i>
<i>Rhododendron albersenianum</i>	<i>Ilex crenata</i> cv. <i>Convexa</i> Makino
<i>Eriobotrya bengalensis</i>	<i>Rhododendron 'wanxia'</i>
<i>Cerasus clarifolia</i>	<i>Spiraea cantoniensis</i>
<i>Rhododendron vialii</i>	<i>Lorpetalum chindense</i> var. <i>rubrum</i>
<i>Amygdalus persica</i> Linn	<i>Photinia serrulata</i>
<i>Ailanthus altissima</i>	<i>Rhododendron rigidum</i> Franch
<i>Rhododendron taronense</i>	<i>Rhododendron annae</i> Franch.

ES 2 694 667 T3

<i>Rhododendron davidii</i>	<i>Rhododendron sinogrande</i>
<i>Sapiumsebiferum</i> (L.) Roxb	<i>Cotoneaster horizontalis</i> Dcne
<i>Michelia maudiae</i> Dunn	<i>Rhododendron aberconwayi</i> Cowan
<i>Rhododendron spinuliferum</i>	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i>
<i>Machilus yunnanensis</i>	<i>Rhododendron decorum</i> Fr
<i>Liquidambarformosana</i> Hance	<i>Itea yunnanensis</i> Franch.
<i>Davidia involucrata</i> Baill	<i>Lonicera nitida</i> 'Maigrun'
<i>Prunus salicina</i> Lindl.	<i>Michelia figo</i>
<i>Sinomanglietia glauca</i>	<i>Liriodendron chinensis</i> (Hemsl.) Sarg
<i>Liquidambar formosana</i> Hance	<i>Olea ferruginea</i> Royle
<i>Acer negundo</i> L.	<i>Eriobotrya japonica</i>
<i>Magnolia soulangeana</i> Soul.	<i>Luclia intermedia</i> Hutch
<i>Vinca minor</i> Linn.	<i>Rhododendron</i> 'jinzhizhu'
<i>Rhododendron ciliatum</i> Hook. f.	Sect. <i>Dacrycarpus</i> Endl
<i>magnolia grandiflora</i> linn	<i>Ophiopogon japonicus</i> cv. 'Nanus'
<i>Trigonobalanus doichangensis</i>	<i>Ligustrum japonicum</i> 'Howardii'
<i>Hedera nepalensis</i>	<i>Rhododendron pulchrum</i>
<i>Quercus variabilis</i>	<i>Pvraacantha angustifolia</i>
<i>Rhododendron simsii</i>	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>
<i>Ilex cornuta</i>	<i>Cedrus deodara</i>
<i>Fatsia japonica</i>	<i>Thujopsis dolabrata</i>
<i>Lindera communis</i>	<i>Ehretia dicksonii</i> Hance
<i>Pistacia weinmannifolia</i>	<i>Acer cappadocicum</i>
<i>Alstonia yunnanensis</i> Diels	<i>Camellia sasanqua</i>
<i>Machilus thunbergii</i>	<i>Araucaria araucana</i>
<i>Bischofia polycarpa</i>	<i>Ficus curtipes</i> Corner
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	<i>Manglietia duclouxii</i>
<i>Viburnum odoratissimum</i>	<i>Stranvaesia davidiana</i>
<i>Lamium galeobdolon</i>	<i>Rhamnus gilgiana</i> Heppl.
<i>Chaenomele japonica</i>	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.
<i>Spiraea blumei</i>	<i>Caragna fruten</i> (L) koch
<i>Agapanthus africanus</i>	<i>Euonymus fortunei</i>
<i>Musella lasiocarpa</i>	<i>Pieris formosa</i>
<i>Cryptomeria fortunei</i>	<i>Fraxinus retusifoliolata</i>
<i>Weigela florida</i>	<i>Sapindus delavayi</i>
<i>Paeonia lactiflora</i>	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	<i>Carayallinoensis</i>
<i>Acer palmatum</i> 'Dissectum'	<i>Micheliamacclurei</i>
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	<i>Eurya loquaiana</i> Dunn
<i>Aesculus wangii</i>	<i>Ficus virens</i>
<i>Mahonia fortunei</i>	<i>Buxus microphylla</i>
<i>Osmanthus fragrans</i>	<i>Lithocarpus henryi</i>

ES 2 694 667 T3

<i>Exbucklandia populnea</i>	<i>Ficus religiosa</i> Linn
<i>Cinnamomum bodinieri</i>	<i>Ligustrum lucidum</i>
<i>Machilus longipedicellata</i>	<i>Disporopsis pernyi</i>
<i>Ficus virens</i> Ait.	<i>Manglietia insignis</i>
<i>Duranta repens</i> Linn.	<i>Olea cuspidata</i>
<i>Manglietia grandis</i>	<i>Hypoestes sanguinolenta</i>
<i>Olea europaea</i> L.	<i>Cornus officinalis</i>
<i>Parakmeria yunnanensis</i>	<i>Daphniphyllum longeracemosum</i>
<i>Tamarix chinensis</i>	<i>Reineckia carnea</i>
<i>pyrus pyrifolia</i>	<i>Acorus gramineus</i>
<i>Prunus serrulata</i>	<i>Cerasus cerasoides</i>
<i>Iris confusa</i>	<i>Dipteronia dyeriana</i> Henry
<i>Iris wilsonii</i>	<i>Lindera megaphylla</i>
<i>Bambusa multiplex</i>	<i>Liquidambar formosana</i> Hance
<i>Senecio scandens</i>	<i>Podocarpus fleuryi</i>
<i>Neolitsea sericea</i>	<i>Morus alba</i> L
<i>Fokienia hodginsii</i>	<i>Zanthoxylum acanthopodium</i>
<i>Viburnum odoratissimum</i>	<i>Ficus altissima</i> Bl.
<i>Cerasus pseudocerasus</i>	<i>Iresine herbstii</i>
<i>Ilex cornuta</i>	<i>Cedrus deodara</i>
<i>Fatsia japonica</i>	<i>Thujopsis dolabrata</i>
<i>Lindera communis</i>	<i>Ehretia dicksonii</i> Hance
<i>Pistacia weinmannifolia</i>	<i>Acer cappadocicum</i>
<i>Alstonia yunnanensis</i> Diels	<i>Camellia sasanqua</i>
<i>Machilus thunbergii</i>	<i>Araucaria araucana</i>
<i>Bischofia polycarpa</i>	<i>Ficus curtipes</i> Corner
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	<i>Manglietia duclouxii</i>
<i>Viburnum odoratissimum</i>	<i>Stranvaesia davidiana</i>
<i>Lamium galeobdolon</i>	<i>Rhamnus gilgiana</i> Heppl.
<i>Chaenomele japonica</i>	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.
<i>Spiraea blumei</i>	<i>Caragana fruten</i> (L) koch
<i>Agapanthus africanus</i>	<i>Euonymus fortunei</i>
<i>Musella lasiocarpa</i>	<i>Pieris formosa</i>
<i>Cryptomeria fortunei</i>	<i>Fraxinus retusifoliolata</i>
<i>Weigela florida</i>	<i>Sapindus delavayi</i>
<i>Paeonia lactiflora</i>	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	<i>Carayallinoensis</i>
<i>Acer palmatum</i> 'Dissectum'	<i>Micheliamacclurei</i>
<i>Hypoestes sanguinolenta</i>	<i>Eurya loquaiana</i> Dunn
<i>Aesculus wangii</i>	<i>Ficus virens</i>
<i>Mahonia fortunei</i>	<i>Buxus microphylla</i>
<i>Osmanthus fragrans</i>	<i>Lithocarpus henryi</i>

Exbucklandia populnea	Ficus religiosa Linn
Cinnamomum bodinieri	Ligustrum lucidum
Machilus longipedicellata	Disporopsis pernyi
Ficus virens Ait.	Manglietia insignis
Duranta repens Linn.	Olea cuspidata
Manglietia grandis	Rhododendron simsii
Uva	Fresa
Loquat	Hojas de piña
Sarcocarpio de piña	Calabaza blanca
Pepino	Brote de ajo joven
Flores de cebollino	Repollo morado
Hoja tierna de toon chino	Flor de repollo morado
Brotes de bambú	Lechuga de repollo
Patata	Brote de papa
Lechuga china	Frijol de caballo
Brotes de guisante	Taro
Flor de repollo Pak Choi	Pak Choi repollo
Crisantemo corona de margarita	Hierba de cilantro

5 *Ensayo de actividad OxOx (método de HPLC):* se analizaron por separado las diferentes partes de los materiales vegetales tales como hoja, raíz, tallo, fruto y flor. Se homogeneizaron los materiales vegetales con agua. Se recogieron las fracciones solubles e insolubles mediante centrifugación. Se resuspendió la parte insoluble con agua DI para análisis de la actividad de OxOx. Se incubaron 40 µl de disolución o suspensión con 360 µl de oxalato 12 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, a 37°C durante 48 horas. Se extinguió la reacción mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1,5 N (suficiente para reducir el pH por debajo de 1,0, un pH al que la enzima es inactiva). Se centrifugó inmediatamente la mezcla de reacción y se analizó el sobrenadante transparente mediante un método de HPLC para detectar oxalato. Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima requerida para degradar 1 µmol de oxalato en un minuto en las condiciones anteriores.

15 *Ensayo de actividad OxOx (método colorimétrico):* se mezclan 20 µl de muestra de disolución en 580 µl de disolución que contiene ácido oxálico 10 mM, ácido hidroxibenzenosulfónico de sodio 4 mM, 2 unidades peroxidasa del rábano y 4-anti-aminoantipirina 1 mM en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0 o 7,4, y se hicieron reaccionar a 37°C durante 10-30 minutos. Se monitoriza el color a 492 nm. Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima requerida para degradar 1 µmol de oxalato en un minuto en las condiciones anteriores.

20 Este ensayo es específico para oxalato oxidasa puesto que una oxidasa genera peróxido de hidrógeno que puede detectarse mediante el desarrollo de color en presencia de peroxidasa, mientras que la descarboxilasa no produce peróxido de hidrógeno.

25 Resultados

OxOx de cáscara de plátano, tallo de remolacha, hojas de *Bougainvillea spectabilis*, hoja joven de *Mirabilis jalapa*, hoja de *Telosma cordatum* (Brum. f.) Merr, hoja de *Jatropha gossypifolia* Linn. var. *elegans* Mueller y hoja de *Sauropus androgynus*(L.) Merr muestra actividad significativa a pH 7,4. Todas las demás contienen o bien actividad oxalato oxidasa, pero a pH ácido, o bien ninguna actividad oxalato oxidasa.

30 En la bibliografía se han notificado OxOx de cáscaras de plátano (Clinical Chemistry, 1985; 31(4):649), tallo de remolachas (Clinical Chemistry, 1983; 29(10):1815-1819), pero ninguna actividad alrededor de pH 7,4. Se sugiere que las OxOx notificadas en la bibliografía pueden ser diferentes de las descritas en este caso. Tal como se demuestra en los ejemplos, se han aislado tres genes de OxOx (5100, 5102 y 5601) a partir de remolacha dulce y todos tienen diferente secuencia de aminoácidos y secuencia de ADN, y también muestran diferentes propiedades. Por tanto, es probable suponer que ninguna de estas OxOx es la misma que la notificada en la bibliografía. Aunque sólo se ha clonado un gen de OxOx a partir de plátano en este trabajo, existen docenas de proteínas similares con más del 50% de similitud, denominadas germina o proteínas de tipo germina en una única planta (Critical Reviews in

Plant Sciences, 2008; 27 (5): 342-375). En la bibliografía se ha notificado OxOx de hojas de *Bougainvillea spectabilis* (Biochem. J., 1962, 85, 33) y también se ha identificado una OxOx en estos experimentos. Se descubren por primera vez en este trabajo OxOx de las otras cuatro plantas.

5 Ejemplo 2

Genes que codifican para OxOx de plátano y remolacha dulce

Clonación de genes de oxalato oxidasa de azúcar de remolacha y plátano

10 Se han probado varios enfoques para clonar los genes de OxOx de estas plantas. El primero es buscar la base de datos pública para encontrar si cualquier gen de OxOx se ha publicado en la planta. Se encuentran genes que se reivindica que codifican para OxOx en remolacha dulce (GenBank: AAG36665.1) y un gen de proteína de tipo germina de plátano (GenBank: AAL05886.1). Estos genes se han sintetizado y expresado mediante *E. coli* y levadura, y se ha encontrado que estos genes codifican para SOD, no OxOx. No es sorprendente, porque SOD de germina y OxOx (también una germina) comparten a menudo más del 50% de similitud. El segundo enfoque es diseñar cebadores de degeneración según las secuencias conservadas de estas OxOx que se notifica que clonan el gen seleccionado como diana de todas las 7 plantas anteriores con actividad OxOx a pH neutro. Sin embargo, no se clonó ningún gen que codifica para proteína con actividad OxOx. El tercer enfoque es buscar el genoma de plátano y remolacha dulce que estaba disponible en el texto provisional. Se analizaron todos los genes de proteína de tipo germina y germina y se recogieron de los datos de genoma de plátano y remolacha dulce. Se ha notificado que un aminoácido, la asparagina en la posición 75 en OxOx de cebada, es la clave para la actividad OxOx (véase la referencia J BIOL CHEM VOL. 281, NO. 10, págs. 6428-6433, 2006). Sólo se ha encontrado un gen de este tipo de plátano (el gen 1013, SEQ ID. 15) y remolacha dulce (el gen 108, SEQ ID. 9), respectivamente. Por tanto, los genes de germina que contienen este aminoácido clave en esa posición correspondiente se clonaron y se expresaron mediante *E. coli*, levadura y planta, pero tampoco se detectó ninguna actividad OxOx. Después de estos experimentos, se plantea la pregunta de si estas OxOx con alguna actividad a pH neutro son germina o proteínas de tipo germina. Por tanto, el cuarto enfoque es obtener una pequeña cantidad de OxOx mediante purificación y usar la proteína para ayudar a encontrar los genes. Se han llevado a cabo diversos esfuerzos para purificar niveles a escala miligramo de OxOx de estos materiales vegetales: cáscara de plátano, tallo de remolacha, hojas de *Bougainvillea spectabilis*, hoja joven de *Mirabilis jalapa*, hojas de *Telosma cordatum* (*Brum. f.*) *Merr*, hojas de *Jatropha gossypifolia* *Linn. var. elegans* *Mueller* y hojas *Sauropus androgynus* (*L.*) *Merr*, que muestran actividad significativa a pH 7,4. Sin embargo, sólo se han purificado OxOx de cáscara de plátano y tallo de remolacha. La OxOx de las dos plantas muestra tamaño similar y composiciones subunitarias como otra germina, lo que indica que todavía son posibles germina o proteínas de tipo germina. Se usó la OxOx purificada para analizar la secuencia de aminoácidos de péptidos generada a partir de las enzimas mediante espectrometría de masas. Entonces, usando las secuencias de aminoácidos buscar la base de datos pública, pero no produjo ningún resultado significativo. Sin embargo, usar estas secuencias de aminoácidos para diseñar cebadores degenerados para clonar genes de remolacha dulce y plátano. Se clonaron el gen 303 (SEQ ID 13) y 122 (SEQ ID 11) de remolacha dulce, pero ninguno de plátano. Los dos genes se han clonado y expresado mediante *E. coli*, levadura y planta, pero no se detectó actividad OxOx de ninguna. Entonces, se usó la OxOx purificada de plátano y remolacha dulce para la determinación de las secuencias N-terminales de las proteínas. Se usaron las secuencias N-terminales para buscar genomas provisionales de remolacha dulce y plátano para encontrar posibles genes, no se encontró ningún gen significativo. Entonces, se analizaron todos los segmentos coincidentes o parcialmente coincidentes y la siguiente secuencia de ADN hasta varios miles de pares de base mediante delección de cualquier posible intrón o error de secuencia. Se encontró finalmente un gen de cada planta (5601 de remolacha dulce y 30640 de plátano). Se diseñaron cebadores para clonar los genes a partir de ARNm. Un gen se ha clonado de plátano, pero tres genes similares se han clonado de remolacha dulce. Se insertaron los genes clonados en vector simple pMD19T (Takara) y se secuenciaron para confirmar su exactitud.

50 Resultados

Secuencias de ADN y proteína de remolacha OxOx 5100, 5102, 5601 y plátano OxOx 30640.

55 SEQ ID 1 - ADN de 5100:

ATGGTCTTTGCAATGAGCTTTACTTCTCATATTTAC-
GTGGCTTCGGCCTCTGATCCTGGTCTCCTACAGGATTTTTGTGTGGGTG-
TAAATGACCCTGATTCAGCAGTGTTTGTAATGGAAAATTCTGCAAGAACCCAAAA-
GACGTGACAATCGACGATTTCTTATACAAAGGGTTTAATATTCCCTCAGA-
CACAAACAACACTCAAAGAGCAGAAGCCACACTAGTAGATGTCAATCGAT-
TTCCAGCACTTAACACATTAGGTGTAGCCATGGCTCGTGTAGACTTT-
GCGTCCTTTGGCCTAACACACCTCATTGACCCCTCGTGGTTCTGAGA-
TATTCGCGGTCTAGAGGGGACTTTATATGCCGGCATTGTCACCACCGATAATAA-
GCTTTTCGACACGGTGTTGA-
GAAAGGGTGACATGATTGTTTTCCCTCAAGGCTTAATCCACTTCCAGCTTAATCTT-
GGCAAGACAGATGCTCTTGCTATTGCCTCTTTTGGGAGCCAATTTCTGGACGAG-
TTAATGTTGCTAATGGTGTCTTTGGA ACTACGCCACAAATTTT-
GGATGATGTACTTACCCAAGCGTTTCAGGTAGATAAGATGGTGATTGAG-
CAACTTCGATCTCAGTTTTTCAGGTCCAAACACATCAATCAACTGGAA-
GATCTATTCTTAAACTCTTAACTGATGTTGCT

SEQ ID 2 - proteína de 5100:

MVFAMSFTSHIYVASASDPGLLQDFCVGVNDPD-
SAVFVNGKFCKNPKDVTIDDFLYKGFNIPSDTNNTQRAEATLVDVNRFPAL-
NTLGVAMARVDFASFGLNTPHLHPRGSEIFAVLEGTLYAGIVTT-
DNKLFDTVLRKGMIVFPQGLIHFQLNLGKT-
DALIASFGSQFPGRVNVANGVFGTTPQILDDVLTQAFQVDKMOVIEQLRSQFSGPN-
TSINTGRSILKLLTDVA

5

SEQ ID 3 - secuencia de ADN de 5102 (sin secuencia de péptido de señal N-terminal, 648 pb):

TCTGATCCTGGTCTCCTACAGGATTTTTGTGTGGGTGTAATGACCCTGATTCAG-
CAGTGTTTGTAATGGAAAATTCTGCAAGAACCCAAAAGACGTGACAATCGAC-

GATTTCTTATACAAAGGGTTTAATATTCCCTCAGACACAAACAACACTCAAAGAG-
CAGAAGCCACACTAGTAGATGTCAATCGATTTCCAGCACTTAACACATTAGGTG-
TAGCCATGGCTCGTGTAGACTTTGCGTCCTTTGGCCTAAACACACCTCATT-
GCACCCTCGTGGTTCTGAGATATTCGCGGTGCTAGAGGGGACTTTATATGCCGG-
CATTGTCACCACCGATTACAAGCTTTTCGACACGGTGTGGA-
GAAAGGGTGACATGATTGTTTTCCCTCAAGGCTTAATCCACTTCCAGCTTAATCTT-
GGCAAGACAGATGCTCTTGCTATTGCCTCTTTTGGGAGCCAATTTCTGGACGAG-
TTAATGTTGCTAATGGTGTCTTTGGAACACTACGCCACAAATTTT-
GGATGATGTACTTACCCAAGCGTTTCAGGTAGATGAGATGGTGATTCAG-
CAACTTCGATCTCAGTTTTTCAGGTCAAACATATCAATCAACACTGGAA-
GATCTATTCTTAAACTCTTAACTGATGTTGCT

SEQ ID 4 - secuencia de proteína de 5102 (sin secuencia de péptido de señal N-terminal, 216 aa):

SDPGLLQDFCVGVNDPDSAVFVNGKFCKNPKDVTIDDFIYKGF-
NIPSDTNNTQRAEATLVDVNRFPALNTLGVAMARVDFASFGLNTPHLHPRGSEI-
FAVLEGTLYAGIVTTDNKLFDTVLRKGMIVFPQGLIHFQLNLGKT-
DALIASFGSQFPGRVNVANGVFGTTPQILDDVLTQAFQVDEMVIQQLRSQFSGPN-
5 TSINTGRSILKLLTDVA

SEQ ID 5 - secuencia de ADN 5601 (sin secuencia de péptido de señal N-terminal, 648 pb):

TCCGATCCTGCACCCCTTCAAGATTTTTGTATTGCTGTAAATGATCCCAATTCTG-
CAGTGCTTGTGAATGGAAAGCTTTGTAAGAACCCAAAAGAAGTGACAA-
TAGATGATTTCTTGTACAAAGGGTTTAATATACCTGCAGACACAAACAACAC-
TCAAGGAGCAAGTGCCACACTAGTGGACATTACTCTATTCCCTGCAG-
TTAACACACAAGGAGTCTCCATGGCTCGTGTGGACTTTGCGCCATT-
GGACTAAACACCCCTCATTTACATCCTCGTGGCTCAGAGGTTTTCGCAG-
TGATGGAAGGGATTATGTATGCTGGTTTTGTGACCACTGATTATAAGCTCTATGATA-
CAATTATAAAAAGGGTGA-
TATTATTGTGTTTCCACAAGGTCTAATTCATTTCCAACCTTAATCTTGGGAAGA-
CAGATGCTTTAGCAATTGCCTCATTTGGGAGCCAAAATCCAGGGAGAATTAA-
TATCGCTGACAGTGTGTTTGGTACTACTCCGCGTGTTCTAGATGATGTGCTTAC-
CAAAGGATTTCAAATCGATGAGTTGTTGGTCAAGCAACTTCGTTCTCAGTTTTC-
TACTGATAATATATCAACAAGCACTGGAAGGTCATTTTTGAAATTGC-
TATCTGAAACTTAT

10 SEQ ID 6 - secuencia de proteína de 5601 (sin secuencia de péptido de señal N-terminal, 216 aa):

SDPAPLQDFCIAVNDPNSAVLVNGKLCCKNPKEVTIDDFLYKGFNIPADTNNTQGA-
SATLVDITLFPVAVNTQGVSMARVDFAPYGLNTPHLHPRGSEVFAVMEGIMYAGFVTT-
DYKLYDTIHKKGDIVFPQGLIHFQLNLGKTDALAIASFSGSNPGRINI-
ADSVFGTTPRVLDDVLTKGFQIDELLVKQLRSQFSTDNISTSTGRSFLKLLSETY

SEQ ID 7 - secuencia de ADN 30640 (sin secuencia de péptido de señal N-terminal, 642 pb):

5

TTTGATCCGAGTCCTCTCCAAGACTTTTTCGTTGCTGACTACGACTCCAAC-
GTGTTTGTGAACGGATTGCGCTGCAAGAAAGCTAAGGATGTCACGG-
CAGATGACTTCTACTTCACCGGCTTAGACAAGCCCGCGAGCACCGCCAAC-
GAGCTTGGCGCAAACATCACTCTCGTCAACGTGGAAC-
GACTCCCAGGCCTCAACTCCCTTGGCGTCGCCATGTCTCGCATCGACTAC-
GCGCCCTTCGGTCTCAACCCTCCTCACTCGCATCCACGATCGTCGGAGATACTG-
CACGTGGCGGAAGGAACGCTCTACGCCGGCTTCGTACCTCCAACAC-
GGAAAACGGCAACCTTCTCTTCGCTAAGAAGCTGAAGAAGGGCGACGCGTTT-
GTGTTCCCGAGGGGCCTCATACTTCCAGTTCAACATCGGGGACAC-
CGATGCGGTGGCGTTTCGCTACCTTCGGCAGCCAGAGCCCGGGTCTCGTCAC-
CACCGCCAACGCACTGTTTCGGATCGAAGCCGCCATCGCTGATTACATTCTT-
GCCCAGGCCGTGCAGCTTAGCAAGACGACCGTGGGCTGGCTTCAGCAGCAG-
CAGTGGTTGGACATCGCTCAAGAATATGGACAACGCTTAGTTCAAGCTAAT

SEQ ID 8 - secuencia de proteína 30640 (sin secuencia de péptido de señal N-terminal, 213 aa):

FDPSPLQDFCVADYDSNVFVNGFACKKAKDVTADDFYFTGLDKPASTANELGA-
NITLVNVERLPGLNSLGVAMSRIDYAPFGLNPPHSHPRSSEILHVAEGTLYAGFV-
TSNTENGNLLFAKKLKKGDAFVFPRLIHFQFNIGD TDAVAFATFGSQSPGLVT-
TANALFGSKPPIADYILAQ AVQLSKTTVGWLQQQQWLDIAQEYGQRLVQAN

10

ADN y secuencias de proteínas de proteínas de remolacha de tipo germina 108, 122, 303 y proteína de tipo germina de plátano 1013.

15

SEQ ID NO: 9 secuencia de ADN 108

ATGGCTCCCCTACTCTACCTTGTAGTATTCTTGCTT-
GCTCCTTTTCTCTCCCATGCTGCGGATCCCGATCCTTTGCTAGATTTTTGTG-
TAGCGGACCTTAATGCCTCTCCCTCATTTGCTAATTTCCCTTGCAAACAAAC-
CTCAAATGTGACCTCTGAAGATTTCTTCTTT-
GATGGGTTTATGAATGAGGGAAACACATCAAACCTCGTTT-
GGATCAAGGGTCACACCCGGAAACGTCCTCACATTTCTGCCCCTTAA-
TATGCTCGGGATTTCAATGAATCGGGTTGATCTTGCTGTGGATGG-
GATGAACCCGCCCCATTCCCACCCACGAGCAAGTGA-
GAGCGGTGTGGTGTGATGAAGGGGAGAGTTCTAGTAGGGTTCGTAACCACGGG-
GAATGTGTACTATTCAAAGGTGTTGGTTCCAGGACAGATGTTT-
GTAATCCCAAGGGGGTTGGTTCAATTTCAAAGAATGTTGGACAAAATAAGGCAC-
TCATCATTACAGCTTTCAATAGTCAGAATCCAGGAGTAG-
TGTTATTATCCTCAACCCTGTTTGGTACAAACCCTTCAATTCCAGATGATGTTTTAA-
GCCAAACTTTCCTAGTGGACCAGAGCATTGTCTGAAGGAATAAAATCCAACCTTTTGA

SEQ ID NO: 10 proteína secuencia 108

MAPLLYLVVFLAPFLSHAADPDPLLDVFCVADLNASPSFANFPCKQTSNV-
TSEDFFFDGMNEGNTSNSFGSRVTPGNVLTFFPALNMLGISMNRVDLAVDGMNP-
PHSHPRASESGVVMKGRVLVGFVTTGNVYYSKVLVPGQMFVIPR-
GLVHFQKNVGQNKALIITAFNS-
QNPGVVLLSSTLFGTNPSIPDDVLSQTFLVDQSIVEGIKSNF*

5

SEQ ID NO: 11 secuencia de ADN 122:

Atggaagtcgctgcagctg-
tatctttctggccgtgttattggctctggttcccctgccctcgccaatgatcctga-
tatgctccaagatgtttgtgctgctgattccacctctggagtgaaattgaatggattt-
gcatgcaaggatgcagcaagcattacaccagaagacttcttcttctgctggaa-
tatccaaacccggaatgacaaacaatacaatgaaatccctagtaaccggagctaac-
gtcgaaaagataccgggttaaacacactcggagtgccatgggtcg-
tatcgacttcggcccaggtggtcttaaccacctcacactcaccac-
gagccacagaaatggctttgtgttataaggagaattggacggtggttctaac-
tacttctaataagctcatttctaagcatatataaaactggtgaaactttgttttcta-
gagggtagtccactttcagaaaaataatggggataaacctgctgcttagtcac-
tgctttaatagtcagttgctggcaccatcaatagctgccacggtgttac-
gtcgacccacctgtccagataatgtttaactatgactttccaagtcggtacta-
aacaagtcagaagatcaaggctaggctcgctcctaagaagtaa

SEQ ID NO: 12 proteína secuencia 122:

mevvaavsflavllalvspalandpdmlqdvvadstsgvklngfackdaasitped-
ffagiskpgmntntmkslvtganvekipgIntlgvsmgridfgpgglnp-
phtpratemvfvlygeldvgfltsnkliskhiktgetfvfprglvhfqknngdk-
paalvtafnsqplpgtqsiaatlftstppvpdnvltmtfqvgtkqvqkikarlapkk

5

SEQ ID NO: 13 secuencia de ADN 303:

Atggcggctgittgggtagtcttggtgggtagcggcggctttgctggtggggtcttt-
gccagcgcctgatatgcttcaagatgittgtgtgctgatcgtacatctggaatattag-
tgaatggattcacatgtaaaaatatgacatgataaccctgaagacttcttctcaccg-
gaattcacaaccaggccaaatcacaataaaaatccttgggtctcgagtcaccg-
gagcgaatgtgcaggacatccctggctcaacacctgggag-
tctcgatggctcgtgctgactttactccctacgggtctaaaccacctcacattcaccta-
gaatcgtccaccctcgtgccactgaaatgatctatgittcttaagggtgaattgtacgtt-
ggttttataacgaccgacaataagctcattccaagggtgtaagctggagaagtattt-
gtttccctagagggttggtcactttcagaaaaacatggtgaaatatccagctgctgcatt-
agctgccttcaacagccaactccaggcactcaacaattt-
gcagctgctctcttacttccaatcctcctgtgtctaatgatgtgtt-
ggctcaggctttaacattgacgaacacaatgtcaaaaagattagggtggccttactccatag

SEQ ID NO: 14 secuencia de proteína 303:

MAAVVVVLVVLAAFAVGVFASDPDMLQDVCVADRTSGILVNGFTCKNMTMITPED-
FFFTGISQPGQITNKILGSRVTGANVQDIPGLNTLGVSMARVDFTPYGLNP-
PHIHPRATEMIYVLKGELYVGFITTDNKLISKVVKAGEVVFPRGLAH-
FQKNMLKYPAAALAAFNSQLPGTQQFAALFTSNPPVSNDVLAQAFNIDEHNVK-
KIRAGLTP

5

SEQ ID NO: 15 secuencia de ADN 1013

ATGGAGTCGCACTACACGAAGAGACCATTCTCCTCTTTCTCTCCTTCAC-
 CGTCCTCCTCGTGTTGATCCGCGCTGACCCTGATCCTCTCCAG-
 GACTTCTGCGTCGCCGACCTCGGAGCTACTGTGGTCGTCAATGGGTTCCCGTG-
 CAAGCCCGCGTCCGGAGTCACGTCCGACGACTTCTTCTTCGCCG-
 GACTGTCCAGGGAGGGCAACACCAGCAATATCTTCGGGTCCAACGTGACCAAC-
 GCCAACATGCTCAGCTTCCCGGGGCTCAACACCCTCGGCGTCTCCATGAAC-
 CGCGTCGACGTGCCCCCGGCGGCAC-
 CAACCCGCCCCACAGCCACCCGAGGGCTAC-
 CGAGCTCATCATCCTCCTCAAGGGCCGGCTGCTGGTGGGGTTCATCAGCACCAG-
 TAACCAGTTCTTCTCCAAGGTCTTGAACCCCGGCGA-
 GATGTTTCGTGGTGCCCAAGGGGCTCATCCACTTCCAGTACAACGTCCGCAAGGA-
 GAAGGCGCTCGCCATCACACCTTCGACAGCCAGCTCCCCGGAGTAG-
 TGATCGCCTCCACCACCCTGTTGCGATCGAATCCGGCGATTCCCGAC-
 GATGTGCTGGCCAAAGCTTTTCAGGTGGAC-
 GCGAAGGTCGTGCTCTCATCAAGTCCAAGTTTGAGAGATAA

SEQ ID NO: 16 secuencia de proteína 1013

MESHYTKRPFLLFLSFTVLLVLIRADPDPLQDFCVADLGATVVVNGFPCKPASGV-
 TSDDFFFAGLSREGNTSNIFGSNVTNANMLSFPGLNTLGVSMNRVDVAPGGTNP-
 PHSHPRATELIILLKGRLLVGFISTSNQFF-
 SKVLNPGEMFVVPKGLIHFQYNVGKEKALAITTFDSQLPGVVIASSTL-
 5 FASNPAIPDDVLAKAFQVDAKVVALIKSKFER*

Ejemplo 3

Expresión recombinante de oxalato oxidasa mediante E. coli

10

Parte 1. Construcción de plásmido y expresión de proteína

Construcción de plásmido de expresión:

15

Se produjo el plásmido pAT delecionando la secuencia de ADN entre el 212^o pb y el 729^o pb del vector pET-32. Entonces se ligaron los genes 5102, 5100, 5601 y 30640 en el vector pET-32 modificado (pAT) usando los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*. Entonces se transformaron los plásmidos resultantes en células competentes *E.coli* Origami B, que se diseñan para ser favorables para la formación de enlaces disulfuro de proteínas expresadas, puesto que hay un enlace disulfuro dentro de cada monómero de OxOx y es esencial para la estructura nativa de la proteína así como actividad enzimática. Véase la figura 1.

20

Producción de proteínas a pequeña escala:

25

Se hicieron crecer células a 37°C en 200 ml de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, y 10 g de NaCl en 950 ml de agua desionizada) complementadas con ampicilina 100 µg/ml. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,6~0,8, se indujo la expresión durante 4 h a 37°C tras la adición de IPTG y MnCl₂ hasta una concentración final a 0,6 mM y 1 mM, respectivamente. Se recogieron las células mediante centrifugación a 9.500 rpm durante 10 min y se suspendieron en tampón arginina 50 mM y luego se sonicaron sobre hielo. Se lavó dos veces la materia insoluble con arginina 50 mM, y se recogió mediante centrifugación durante 15 min a 9.500 rpm. El material insoluble contiene aproximadamente el 80% del cuerpo de inclusión de OxOx.

30

ES 2 694 667 T3

Producción de proteínas a gran escala:

5 Para la producción a gran escala de proteínas de OxOx, se hicieron crecer células de *E.coli* Origami B en un fermentador de 7 l (volumen de trabajo de 3,5 l) en medio LB complementado con ampicilina 100 µg/ml y MnCl₂ 5 mM. Las concentraciones iniciales de glicerol y extracto de levadura fueron de 12 g/l. Se llevó a cabo la fermentación a 30-37°C con aireación vigorosa y agitación y se mantuvo el pH del medio a 6,85 mediante la adición de amoniaco al 10%. Después de 8 h de crecimiento discontinuo, se hicieron crecer las células en un modo
10 semicontinuo con un suministro continuo de glicerol y extracto de levadura. Se indujo el cultivo a DO₆₀₀ de 20 con IPTG 0,8 mM, se cultivó durante otras 20 h, y luego se recogió.

Parte 2. Replegamiento de proteína

15 Se rompieron células de *E. coli* mediante homogeneizador o sonicación. Se obtuvo el cuerpo de inclusión de OxOx lavando las células rotas y se recogió mediante centrifugación a baja velocidad, que la conocen bien los científicos en el campo. Se disolvió el cuerpo de inclusión purificado en urea 8 M, pH 8,0. Se obtuvo la fracción soluble tras incubación a temperatura ambiente durante 20 min seguido por centrifugación.

20 Se replegaron las proteínas mediante dilución rápida:

Se disolvieron cuerpos de inclusión en urea 8 M, pH 8,0. Se logró dilución rápida añadiendo la disolución de OxOx de urea 8 M gota a gota en tampón de replegamiento con agitación rápida.

25 Los tampones de replegamiento que se han usado:

1. Tris 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, pH 8,0
2. Tris 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, arginina 400 mM, pH 8,0
- 30 3. Tris 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, α-ciclodextrina 100 mM, pH 8,0
4. Tris 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, β-ciclodextrina al 2%, pH 8,0
- 35 5. Tris 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, sacarosa al 40%, pH 8,0
6. Tris 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, glucosa al 40%, pH 8,0
7. Tris 20 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, pH 8,0
- 40 8. Tris 20 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, arginina 400 mM, pH 8,0
9. Tris 20 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, betaína 50 mM, pH 8,0
- 45 10. Tris 20 mM, MnCl₂ 1 mM, betaína 50 mM, pH 8,0
11. Tris 20 mM, MnCl₂ 0,5-5 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, betaína 50 mM, pH 8,0
12. Tris 20 mM, MnCl₂ 1 mM, GSH 1 mM/GSSG 0,2 mM, betaína 50 mM, pH 4,0-10,0
- 50 13. Tris 20 mM, MnCl₂ 1 mM, betaína 50 mM, 1-hexanol 0,05 mM, acetamida 50 mM, KCl 300 mM, pH 8,0

Resultados:

55 1. Se expresa OxOx de plátano como cuerpo de inclusión con un rendimiento en el intervalo de 0,2-0,6 gramos por litro de cultivo en un matraz, 2-6 gramos por litro de cultivo en un fermentador. El rendimiento de producción puede mejorarse tras la optimización de las condiciones. Los cuerpos de inclusión muestran habitualmente un poco de actividad OxOx, pero tras el replegamiento, se obtiene fácilmente una actividad específica en el intervalo de 0,1 a 10 unidades por mg de proteína tras purificación con columna Phenyl-Sepharose.

60 2. Se expresa OxOx 5100 de remolacha dulce como cuerpos de inclusión con un rendimiento en el intervalo de 0,1-0,5 gramos por litro de cultivo en un matraz, 1-5 gramos por litro de cultivo en un fermentador. El rendimiento de producción puede mejorarse tras la optimización de las condiciones. Los cuerpos de inclusión muestran habitualmente un poco de actividad OxOx, pero tras el replegamiento, se obtiene fácilmente una actividad específica en el intervalo de 0,1 a 15 unidades por mg de proteína tras purificación con columna Phenyl-Sepharose.

65 3. Se expresa OxOx 5102 de remolacha dulce como cuerpos de inclusión con un rendimiento en el intervalo de 0,1-0,5 gramos por litro de cultivo en un matraz, 1-5 gramos por litro de cultivo en un fermentador. El rendimiento de

producción puede mejorarse tras la optimización de las condiciones. Los cuerpos de inclusión muestran habitualmente un poco de actividad OxOx, pero tras el replegamiento, se obtiene fácilmente una actividad específica en el intervalo de 0,1 a 10 unidades por mg de proteína tras purificación con columna Phenyl-Sepharose.

4. Se expresa OxOx 5601 de remolacha dulce como cuerpos de inclusión con un rendimiento en el intervalo de 0,1-1 gramos por litro de cultivo en un matraz, 1-10 gramos por litro de cultivo en un fermentador. El rendimiento de producción puede mejorarse tras la optimización de las condiciones. Los cuerpos de inclusión muestran habitualmente un poco de actividad OxOx, pero tras el replegamiento, se obtiene fácilmente una actividad específica en el intervalo de 0,1 a 10 unidades por mg de proteína tras purificación con columna Phenyl-Sepharose.

5. Las condiciones de replegamiento no se han optimizado, pero se ha observado que replegar el pH a 8,0, estabilizadores o potenciadores de la solubilidad incluyendo betaína, NaCl o KCl, acetamida y 1-hexanol, y la concentración de MnCl₂ alrededor de 1 mM son importante para un replegamiento eficaz.

Ejemplo 4

Expresión recombinante de oxalato oxidasa mediante *P. pastoris*

Construcción de vector de expresión

Se amplificaron los genes de remolacha 5102 y 5601 y plátano 30640 de un vector simple pMD18-T que contenía estos genes usando un par de cebadores diseñados para introducir un sitio *Xho* I seguido por un sitio de escisión de proteasa Kex2 en el extremo 5' y un sitio de restricción *Not* I en el extremo 3' (tabla 1). Se digirieron los productos de PCR con *Xho* I y *Not* I y se clonaron en los vectores pPICZαB y pGAPZαA digeridos con las mismas enzimas de restricción, dando como resultado los plásmidos recombinantes de Zα-5102, GAPZα-5102, Zα-5601, GAPZα-5601, Zα-30640 y GAPZα-30640 (figuras 2-7). Los plásmidos recombinantes de Zα-5102, Zα-5601 y Zα-30640 se linealizaron con *Pme* I (*Mss* I) y GAPZα-5102, GAPZα-5601 y GAPZα-30640 se linealizaron con *Bln* I (*Avr* II). Entonces, todos los vectores linealizados se electrotransformaron en *P. pastoris* X-33 según los métodos de transformación de alta eficacia de *P. pastoris* pretratada con acetato de litio y ditiotreitol, que los recomendaron Wu S y Letchworth GJ (2004 Protein Expression).

Tabla 1. Cebadores usados para construir vectores de expresión

SEQ ID NO:	Oligonucleótidos	Secuencia (de 5' a 3')
17	5102F	CCGCTCGAGAAAAGATCTGATCCTGGTCTCCTACAG
18	5102R	AAATATGCGGCCGCTCAAGCAACATCAGTTAAGAGTT
19	5601F	CCGCTCGAGAAAAGATCCGATCCTGCACCCCTT
20	5601R	AAATATGCGGCCGCTCAATAAGTTTCAGATAGCAATTT
21	30640F	CCGCTCGAGAAAAGATTTGATCCGAGTCCTCTCCA
22	30640R	AAATATGCGGCCGCTCAATTAGCTTGAACCTAAGCGTTG

Expresión de proteína

Se seleccionaron inicialmente clones positivos mediante placas de medio YPDS (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, dextrosa 20 g/l, sorbitol 1 M y agar 20 g/l) que contenían Zeocin 100 µg/ml. Entonces, se examinaron adicionalmente transformantes de múltiples copias mediante placas de resistencia de YPDS que contenían Zeocin a una concentración final de 1 mg/ml. En primer lugar se comprobaron las colonias seleccionadas con PCR y después se secuenciaron para verificar un gen correcto insertado en el cromosoma de levadura. Se seleccionaron los clones de alta resistencia a Zeocin para comprobar su expresión mediante fermentación en matraz con agitación.

Los medios de crecimiento e inducción en el matraz con agitación fueron BMGY (extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), tampón fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0, base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 1,34% (p/v), glicerol al 1% (p/v), biotina al 0,04% (p/v)) y BMMY (su composición es similar a BMGY, pero con metanol al 1,0 % (v/v) en lugar de glicerol). Se inoculó en primer lugar una única colonia de una cepa seleccionada en una botella de 20 ml con 4 ml de medio YPD y se hizo crecer a 28°C durante 18-20 h. Entonces, se inoculó el 4% (v/v) del cultivo en un matraz de 500 ml que contenía 50 ml de (o matraz de 250 ml que contenía 25 ml de) BMGY. Se hicieron crecer las células a 28°C, agitando a 220 rpm, durante 18-20 h para alcanzar una DO₆₀₀ de 3,0-6,0, luego se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 50 ml de medio BMMY que contenía MnCl₂ 5 mM para inducción con metanol. Se fijó la temperatura de inducción a 28°C, y se añadió metanol al 100% diariamente para alcanzar concentraciones de metanol al 1,0% (v/v). Tras 96-120 h de inducción con metanol, se recogió el sobrenadante del cultivo mediante centrifugación a 9500 rpm durante 5 min a 4°C, y se usó para el ensayo de actividad OxO y SDS-PAGE. Se tiñeron las proteínas con azul brillante Coomassie R-250. Se concentraron todas las muestras de sobrenadante mediante precipitación con TCA. Todas las muestras usadas para análisis SDS-PAGE son 30 µl de sobrenadante concentrado. Para la expresión constructiva del promotor GAP, el crecimiento fue

medio BYPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l, biotina 400 µg/l, MnCl₂ 5 mM y tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0) y se hicieron crecer las células a 28°C, con agitación a 220 rpm. Añadir glucosa al 2% en medio BYPD después de 48 h de cultivo. Después de 72 h de cultivo, se recogió y se analizó el sobrenadante del cultivo como en las condiciones anteriores.

5 Fermentación semicontinua: se produjo el inóculo (cualquier cultivo de levadura recombinante descrito anteriormente) a 30°C en un matraz de 2 l que contenía 400 ml de medio YPD agitado a 220 rpm durante 18 h. Entonces, se inoculó el 10% (v/v) del inóculo en el fermentador de 7 l que contenía 2,8 l de medio FM22 (KH₂PO₄, 42,9 g/l; (NH₄)₂SO₄, 5 g/l; CaSO₄·2H₂O, 1,0 g/l; K₂SO₄, 14,3 g/l; MgSO₄·7H₂O, 11,7 g/l; glicerol, 40 g/l y disolución de sal traza PTM4 2,5 ml/l). Disolución de sal traza PTM4. La disolución PMT4 se componía de (g/l): CuSO₄·5H₂O, 2,0; NaI, 0,08; MnSO₄·H₂O, 3,0; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,2; H₃BO₃, 0,02; CaSO₄·2H₂O, 0,5; CoCl₂, 0,5; ZnCl₂, 7; FeSO₄·7H₂O, 22; biotina 0,2 y H₂SO₄ concentrado 1 ml/l [18]. La disolución semicontinua de glicerol contenía (l⁻¹): 500 g de glicerol (100%) y 4 ml de disolución madre PTM4. La disolución semicontinua de metanol consistía en 4 ml de disolución madre PTM4 y 1 l de metanol puro. Una vez se agotó el glicerol del caldo de cultivo, se inició una fase semicontinua exponencial con glicerol de 8 h a una velocidad de crecimiento de 0,16 h⁻¹. Se llevó a cabo la estrategia semicontinua limitada con metanol al final de la fase de transición del glicerol. Se reguló la velocidad de administración de metanol para mantener DO por encima del punto establecido en el caldo de cultivo según las recomendaciones de las Pautas del Procedimiento de Fermentación con *Pichia* (Invitrogen). Se fijó la temperatura a 30°C en las fases discontinuas y semicontinuas de glicerol, y entonces se disminuyó hasta 25°C al inicio de la inducción con la fase de metanol. Se mantuvo el valor de pH a 5,5 mediante la adición de hidróxido de amonio al 28% (p/p). Se mantuvo el nivel de DO al 20-50% de saturación de aire mediante un control en cascada de la velocidad de agitación a 500-800 rpm con una velocidad de flujo de aire de 150-400 l/h. Se controló la espumación mediante la adición de agente antiespumante (Dowfax DF103, EE.UU). Se bombeó el medio de alimentación semicontinuo en el fermentador según un protocolo predeterminado.

25 Purificación de proteína recombinante

Se realizó el procedimiento de purificación básicamente tal como sigue: se concentró y se dializó el caldo de fermentación libre de células que contenía la enzima secretada durante la noche contra tampón ácido cítrico y fosfato de potasio 50 mM pH 3,5 y luego se cargó en una columna de intercambio catiónico, o se dializó durante la noche contra tampón ácido cítrico y fosfato de potasio 50 mM pH 7,5 y luego se cargó en una columna de intercambio aniónico. Si no fuera suficiente, se aplica una columna Phenyl-Sepharose. Se agruparon las fracciones a través del flujo y se concentraron mediante ultrafiltración para SDS-PAGE y ensayo de actividad.

35 Resultados

Se han expresado satisfactoriamente los tres genes de oxalato oxidasa de 5102, 5601 y 30640 en *P. pastoris* con un rendimiento en un intervalo de 0,01-1 mg por litro de cultivo, tal como se muestra mediante SDS-PAGE con una banda a un peso molecular de 24 kD (figuras 8-11). Las oxalato oxidasa purificadas a partir del caldo, mostraron todas ellas una actividad de degradación de oxalato a pH 7,4.

Ejemplo 5

45 *Producción de oxalato oxidasas en plantas mediante expresión transitoria*

45 Construcción de vectores de expresión

Se amplificaron los genes para la expresión transitoria (5601 y 5102 de remolacha azucarera, 30640 de platano) mediante cebadores específicos de gen flanqueados por los sitios de restricción *Xba*I y *Kpn*I. Tras la digestión con *Xba*I y *Kpn*I, se clonaron los fragmentos amplificados (figuras 12-13) en pHTE para producir pHTE-5601, pHTE-5102 y pHTE-30640 (figura 14), respectivamente. Se seleccionaron todos los plásmidos recombinantes positivos mediante PCR de colonias o mediante digestión enzimática y se introdujeron por separado en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 mediante el método de congelación/descongelación.

55 5.1 Expresión transitoria en hojas de tabaco

Materiales de plantas

Se hicieron crecer plantas de *N. benthamiana* de tipo natural en un invernadero con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 h a 25°C durante de 5 a 8 semanas.

5.1.1 Preparación de suspensiones y cultivos bacterianos

65 1. Se prepararon precultivos 2 días antes de la infiltración inoculando 3 ml de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g NaCl en 950 ml de agua desionizada) que contenía rifampicina 25 mg/l y kanamicina 50 mg/l con colonias aisladas de cepas de *Agrobacterium* que albergan plásmidos de expresión, durante la noche a 28°C bajo agitación constante a 220 rpm para crecer preferentemente hasta una DO (600 nm) >1,2.

2. Inocular medio LB nuevo que contiene rifampicina 25 mg/l, kanamicina 50 mg/l y acetosiringona 20 μ M con precultivo a una razón de 1:100. Para cada planta que va a infiltrarse, deben prepararse 20 ml de cada cepa. Se incubaron los cultivos a 28°C bajo agitación constante a 220 rpm hasta una DO (600 nm) de 0,8-1,2 (~18 h).

3. Centrifugar los cultivos (5000 rpm; 5 min) y desechar el sobrenadante.

4. Resuspender los sedimentos bacterianos en 5 volúmenes de disolución de resuspensión de bacterias (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico (MES) 10 mM) pH 5,5, MgSO₄ 10 mM y acetosiringona 100 mM), e incubar durante 4 h a temperatura ambiente antes de su uso.

5.1.2 Infiltración con jeringa e incubación de plantas

1. Llenar una jeringa de 1 ml o 3 ml (sin aguja) con suspensión bacteriana, y sujetar la hoja que va a infiltrarse entre el dedo índice y la jeringa, estando la jeringa sobre el lado abaxial de la hoja. Empujar suavemente el émbolo para forzar a la suspensión bacteriana a entrar en la hoja y mantener una presión uniforme durante la infiltración. Se observa humectación de la hoja alrededor del punto de infiltración ya que la suspensión entra en el tejido en el espacio apoplástico. Para cada punto de infiltración, debe llenarse una superficie ~7 cm². Pueden ser necesarios varios puntos de infiltración para inocular completamente cada hoja.

2. Infiltrar un número máximo de hojas en cada planta y retirar todas las hojas sin infiltrar así como las yemas apicales y auxiliares para evitar el crecimiento de hojas sin infiltrar durante el periodo de incubación.

3. Incubar las plantas infiltradas en el invernadero durante 7 días, regar las plantas según se necesite y continuar la fertilización con nitrógeno.

5.1.3 Ensayo de actividad de OxOx en disco de hoja

Se recogieron hojas de tabaco agroinfiltradas 7 días tras la infiltración (dpi) para los ensayos de actividad de OxOx. Se llevó a cabo un ensayo histoquímico de la actividad de OxOx. El tampón histoquímico contiene succinato 40 mM, ácido oxálico 2,5 mM, peroxidasa del rábano 5 U/ml, 4-cloro-1-naftol 0,6 mg/ml, etanol al 60% (V/V), pH 5,0. Se añadieron discos de hojas al tampón y se observaron tras la incubación a temperatura ambiente durante la noche. El control son los discos de hojas producidos del mismo modo que los discos de hojas sometidos a prueba excepto porque no se agroinfiltró gen de OxOx en las hojas de tabaco.

Los resultados se facilitan a continuación junto con los resultados de los experimentos que se refieren a la expresión transitoria en guisante.

5.2 Expresión transitoria en guisante

5.2.1 Materiales de plantas

Se obtuvieron las semillas de la planta de guisante (*P. sativum*) del mercado local. Se sembraron las semillas y se hicieron crecer las plantas en una cámara de crecimiento de plantas a 25°C bajo un ciclo de 16 h de luz fluorescente fría/8 h de oscuridad.

5.2.2 Cultivo bacteriano, preparación de la suspensión e infiltración a vacío

Se hicieron crecer cultivos de *Agrobacterium* GV3101, que llevaban vectores binarios, en medios YEB modificados (extracto de levadura 6 g/l, peptona 5 g/l, sacarosa 5 g/l, MgSO₄ 2 mM) con antibióticos (100 mg/ml de kanamicina, 50 mg/ml de rifampicina,) durante 2 días a 28°C. Para el crecimiento a escala aumentada final, se diluyeron cultivos de 2 días iniciales 1:100 en el mismo medio YEB complementado con antibióticos, MES 10 mM, pH 5,6, 20 μ M de acetosiringona y se permitió que crecieran 18-24 h hasta una DO₅₉₅ nm de aproximadamente 2,4. Se complementaron las células bacterianas con 55 g/l de sacarosa y acetosiringona 200 μ M y se incubó la suspensión durante 1 h a 22°C. Se añadió Tween20 hasta concentraciones finales del 0,005% y se usó la suspensión para la infiltración a vacío. Se colocó una cantidad de 1,2 l de suspensión de *Agrobacterium* pretratada en un vaso de precipitados de vidrio de 2 l dentro de un vacío. Se sumergieron las plantas de guisante completas en la suspensión y se mantuvieron durante 1 min a vacío (0,07-0,1 MPa) y se liberó rápidamente el vacío. Se enjuagaron las raíces de las plantas de guisante en agua y se dejaron durante 5-7 días a 20-22°C con 16 h de luz cada día. Tras 5-6 días de incubación, se cortaron las plantas de guisante desde la base y se homogeneizaron para la extracción de proteínas.

5.2.3 Ensayo enzimático

Para el análisis de los niveles de expresión de proteína, se extrajo la proteína con tampón de extracción (ácido cítrico - fosfato 50 mM, pH 7,0). El tampón de extracción y las plantas de guisante recogidas estaban en una razón 1:1 (v/p). Se cortaron los tejidos desde la base y se homogeneizaron en una mezcladora a alta velocidad durante 1 min. Se centrifugó el homogenado durante 15 min a 7000 g. Se centrifugó el sobrenadante durante 15 min a 14.000

g y se analizaron los sobrenadantes resultantes mediante gel de SDS-PAGE al 12%. Se lavó el sedimento dos veces mediante resuspensión en 10 vol. del medio de homogenización que contenía Triton X-100 al 1% (p:v) y cuatro veces con 30 vol. del mismo medio sin Triton X-100. Tras cada lavado se recogió el sedimento mediante centrifugación a 1000 g durante 10 min. Se consideró que el sedimento final era la fracción de pared celular purificada, y se usó para someter a prueba la actividad de OxOx mediante ensayo colorimétrico. Para la purificación de OxOx, se precipitó el sobrenadante de homogenado centrifugado con sulfato de amonio saturado al 80%. Se redisolvió el sedimento en 50 ml de tampón A (ácido cítrico-fosfato 50 mM, pH 6,0, NaCl 2 M), y se centrifugó la suspensión resultante durante 20 min a 14.000 g. Se cargó el sobrenadante resultante sobre una columna de Phenyl Sepharose HP previamente equilibrada con tampón A. Se eluyó la proteína con un gradiente lineal de NaCl (2-0 M) en el mismo tampón y se recogieron las fracciones a una velocidad de 0,5 ml/min. Se detectó en las fracciones recogidas la actividad de OxOx mediante ensayo colorimétrico. Entonces se mezclaron entre sí las fracciones que tenían actividad de OxOx y volvieron a cargarse sobre una columna de Q Sepharose. Se eluyó OxOx con un gradiente lineal de NaCl (0-2 M) en tampón A. Se sometieron a prueba todas las fracciones recogidas para determinar la actividad de OxO mediante el método colorimétrico.

Resultados

1. Se han amplificado los genes de OxOx 5102, 5601 y 30640 (figuras 12-13)
2. El vector de expresión de plantas para OxOx 5102, 5601 y 30640 (figura 14)
3. Los genes para OxOx 5102, 5601 y 30640 se expresan con actividad de en hojas de tabaco (figuras 15)
4. Los genes para OxOx 5102, 5601 y 30640 se expresan con actividad de OxOx en hojas de guisante (figuras 16)
5. OxOx 5102 expresada por hojas de guisante se ha purificado y muestra actividad (figuras 17 y 18)
6. Los niveles de expresión de OxOx 5102, 5601 y 30640 por hojas de guisante en el intervalo de 0,01-5 mg por gramo hojas nuevas, pero la mayoría de la OxOx expresada está asociada con el material sólido (figura 16)

Ejemplo 6

La actividad de oxalato oxidasas expresadas por E. coli a diferente pH

Ensayo de actividad: la disolución de enzima de 10 µl se añade a 190 µl de 4-aminoantipirina 800 mg/l, 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfonato de sodio 4,8 mM, 10 unidades por ml de peroxidasa del rábano, oxalato 5 mM, fosfato 50 mM.

Se coloca la mezcla a 37°C durante 10-60 min en un lector de placas para leer la DO₆₀₀. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 µmol de formiato a partir de oxalato en las condiciones anteriores.

Perfil de pH de actividad: se sometieron a prueba muestras tal como se describió anteriormente usando una serie de tampones dentro de un intervalo de pH de 4,5-8,0 (citrato 50 mM para pH 4,5-6,0 y fosfato de potasio 50 mM para pH 6,0-8,0).

Esta prueba se usa para someter a prueba las oxalato oxidasas para determinar la actividad de degradación de oxalato tal como se le hace referencia en las reivindicaciones.

Resultados

La actividad máxima es de 18,2 unidades por mg para 5100, 19,5 unidades por mg para 5102, 18,7 unidades por mg para 5601 y 14 unidades por mg para 30640. Para una comparación fácil, se facilita la actividad para cada enzima a diferente pH en la tabla 1 y la figura 19 como actividad relativa, que se calcula mediante la actividad dividida entre la actividad máxima.

Tabla 1. La actividad relativa de OxOx a pH 4,5-8

pH	5100	5102	5601	30640
4,5	69,23	83,42	45,10	45,52
5	88,08	91,23	79,34	69,11
5,5	92,95	94,30	100,00	80,37
6,0	99,99	96,17	77,60	97,92
6,5	92,60	100,00	49,20	99,99
7,0	90,69	95,10	36,73	92,56
7,5	82,00	92,60	21,78	65,33
8,0	81,75	87,50	18,17	42,17

Ejemplo 7Lavado de cuerpos de inclusión - OxOx-B5102

5 Se resuspendieron los sedimentos celulares recogidos en una razón de 30 g de pasta de células por 1 l de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, urea 2 M, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, pH 8,0). Se añadió nucleasa benzonasa (100 unidades por litro con MgCl₂ 0,5 mM) a la suspensión de células para digerir ácido nucleico de *E. coli* (incluyendo ADN y ARN), se incubó a 37°C durante 15 min. Se hicieron pasar las células pretratadas a través de un homogeneizador preenfriado (NTI, EE.UU.) 4 veces a 1100 bares de presión, luego se centrifugaron a 8000 g durante 10 min en botellas de 500 ml a 4°C. Se resuspendieron los sedimentos y se lavaron con tampón de lavado 3 veces y agua desionizada dos veces. Se analizó la pureza de los cuerpos de inclusión mediante SDS-PAGE. La pureza de los cuerpos de inclusión alcanzó habitualmente más del 80%.

Ejemplo 8Purificación mediante Q-sepharose de cuerpos de inclusión

20 Se disolvieron los cuerpos de inclusión lavados del ejemplo 7 con una pureza >80% en tampón de urea (Tris-HCl 20 mM, urea 8 M, pH 8,0) y se centrifugaron a 13000 g durante 10 min. Se cargó el sobrenadante sobre una columna de Q-sepharose preequilibrada con el tampón de urea y se lavó adicionalmente con volúmenes de 5 columna (CV) con el mismo tampón. Se eluyeron las impurezas mediante tampón de elución B (urea 8 M, NaCl 30 g/l, Tris-HCl, pH 8,0) con 6 CV. Se eluyó la proteína OxOx-B5102 mediante el tampón de elución C (urea 8 M, NaCl 160 g/l, Tris-HCl, pH 8,0). La pureza de los cuerpos de inclusión de OxOx-B5102 tras la purificación en columna de Q-sephrose alcanzó habitualmente más del 95%. Se concentró la disolución de cuerpos de inclusión de OxOx-B5102 purificados hasta 5 mg/ml para el replegamiento de proteína mediante tubos de ultrafiltración 10K.

Ejemplo 9Replegamiento de cuerpos de inclusión

30 Se realizó el replegamiento tal como se describo anteriormente en el presente documento.

Ejemplo 10Purificación en Phenyl Sepharose de OxOx-B5102

35 Se añadió NaCl a la mezcla de OxOx-B5102 replegada hasta una concentración final de 500 mM, y luego se hizo pasar a través de una membrana de 0,45 µm. Se cargó la disolución de OxOx-B5102 clarificada en una columna de Phenyl Sepharose preequilibrada con 5 CV de tampón de equilibrio (Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0). Se lavó adicionalmente la columna con 1,5 CV de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, NaCl 250 mM, pH 8,0), y luego se eluyó OxOx-B5102 mediante tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, isopropanol al 20%, pH 7,0). Se precipitó la proteína diana añadiendo NaCl a la disolución hasta 50 mM y se recogió mediante centrifugación a 12000 g durante 10 min, 4°C. Se redisolvieron los sedimentos en tampón borato (Na₂B₄O₇·H₃BO₃ 10 mM, pH 9,0) para la pegilación. Se analizó la pureza de la muestra de OxOx-B5102 recogida mediante SDS-PAGE, se analizó la actividad de OxOx-B5102 mediante el ensayo de actividad.

Ejemplo 11Pegilación y purificación de PEG-OxOx

50 Se ajustó la concentración de OxOx-B5102 en tampón borato hasta 2 mg/ml para la pegilación. Se usó una razón 10 veces de moléculas de PEG con respecto al número de residuos de lisina sobre la superficie de OxOx para la reacción de pegilación. Se sometieron a prueba uno a uno diferentes tamaños de éster succinimidilcarboximético de metoxi-PEG (mPEG-SC) a 2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 20 kD de 4 brazos, 30 kD, 40 kD y 40 kD de 4 brazos. Se añadió gradualmente el mPEG-SC en disolución de OxOx-B5102 y se mezcló suavemente usando un agitador magnético. Se mantuvo la reacción durante 6 h a 28°C, y luego se detuvo añadiendo glicina.

60 Se cargó la muestra de OxOx-B5102 pegilada sobre cromatografía de exclusión molecular (GE HiLoad Superdex 16/600GL, EE.UU.) preequilibrada con tampón fosfato (K₂HPO₄~KH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4) y se eluyó mediante el mismo tampón a una velocidad de elución de 1 ml/min. Se recogió la proteína diana.

Ejemplo 12Reducción de oxalato en plasma y oxalato en orina en modelo de rata

65 Se adquirieron 30 ratas Sprague Dawley (SD) macho, que pesaban aproximadamente alrededor de 130-150 g y

menos de 5 semanas del centro experimental animal local. Se alojaron las ratas en un sistema de jaula ventilada individual (IVC) de plástico (temperatura 18–26°C, humedad del 40-70%) y se alimentaron con agua destilada y alimento de ratas regular cada día. Tras 1 semana de aclimatización, se dividieron las ratas aleatoriamente en un grupo de control y 4 grupos experimentales (seis ratas por grupo) y se transfirieron a jaulas metabólicas con una única ocupación. Las ratas en el grupo de control se alimentaron con agua y alimento regular; los grupos experimentales se alimentaron con alimento regular y etilenglicol al 1% como agua potable. Se recogió una muestra de sangre (aproximadamente 0,3 ml) de la vena de la cola y se añadió heparina a la sangre como anticoagulante. Se obtuvo suero inmediatamente a partir de la muestra de sangre nueva mediante centrifugación a 5000 g durante 5 min a 4°C. Se recogió una muestra de orina del tubo recogida de orina de la jaula metabólica cada 12 h (8:30 y 20:30) y se acidificó usando HCl 2 M inmediatamente hasta pH 1,5–2,0. Se detectó oxalato en suero y orina de todas las ratas y se monitorizó hasta que el nivel de oxalato era estable, luego se inyectó PEG-OxOx-B5102 a través de la vena.

Se analizó el oxalato en suero usando el método de fluorescencia de 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (rojo Amplex). El procedimiento: se acidificaron las muestras de suero nuevas hasta pH 2,0 y se eliminaron las proteínas séricas mediante filtración con tubos de ultrafiltración 10K. Se añadió el filtrado (10 µl) a una multiplaca de 96 pocillos para 6 pocillos. Se añadió el tampón de reacción que contenía oxalato oxidasa (tampón citrato 100 mM, pH 5,4, rojo Amplex 10 µM, HRP 1 U/ml, OxOx-B5102 0,1 U/ml) a 3 pocillos y se añadió el tampón de reacción de fondo sin OxOx (tampón citrato 100 mM, pH 5,4, rojo Amplex 10 µM, HRP 1 U/ml) a los otros 3 pocillos. Se incubaron todas las reacciones a 25°C durante 30 min, luego se detectó la fluorescencia de cada pocillo usando un lector de multiplacas de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 538 nm; longitud de onda de emisión: 590 nm). La fluorescencia de una muestra es el valor promedio de los tres pocillos tras restar el promedio de los tres pocillos de control de fondo. Se calculó la concentración de oxalato mediante el valor de fluorescencia, que se calibró mediante la curva patrón de oxalato.

Se detectó la concentración de oxalato en orina usando el ensayo colorimétrico (kit de oxalato Trinity disponible comercialmente adoptado). El procedimiento de operación se realizó según el manual del kit.

Tras el periodo de aclimatización, se administró OxOx-B5102 pegilado con 3 pesos moleculares diferentes de PEG (PEG de 20 kD, 30 kD y 40 kD) a las ratas en 3 grupos experimentales, respectivamente, 0,2 mg de OxOx cada vez por rata, durante 3 días consecutivos. Se administró solución salina a las ratas en el cuarto grupo experimental, registrado como grupo de control de placebo a la misma dosis. Se alimentaron las ratas en el control regular como habitualmente sin ningún tratamiento. Se monitorizaron cada día el oxalato en suero y oxalato en orina. Los resultados mostraron que PEG-OxOx-B5102 podía reducir el 40–50% del oxalato en suero y el 20–40% del oxalato en orina en comparación con el grupo de placebo (figura 21 y figura 22).

Ejemplo 13

Evaluación de la inmunogenicidad de PEG-OxOx-B5102

Se inyectaron por vía intravenosa OxOx-B5102 y OxOx-B5102 pegilados con diferentes pesos moleculares de PEG (2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 30 kD y 40 kD) en ratas SD para la evaluación de la inmunogenicidad, respectivamente, a través de las venas de la cola cada semana durante 4 semanas. La dosis era de 0,2 mg de OxOx cada vez. Se recogieron muestras de suero y se detectó el título de anticuerpo usando el método de ELISA.

El procedimiento del método de ELISA: (1) se recogieron muestras de suero de rata a diferentes puntos de tiempo (0 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 45 d, 60 d) tras la inyección de PEG-OxOx-B5102 y se almacenaron a -20°C hasta su uso. (2) Diluir OxOx-B5102 hasta una concentración final de 10 µg/ml en tampón de recubrimiento (tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6) y transferir 100 µl a cada pocillo de una placa de ELISA de unión a proteína, de alta afinidad. Cubrir la placa con papel de aluminio e incubar a 4°C durante la noche. (3) Llevar la placa hasta temperatura ambiente, retirar la disolución de anticuerpo de captura, lavar 3 veces con tampón PBS-T (KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄·12H₂O 8,1 mM; NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; Tween-20 al 0,05%) y bloquear los sitios de unión inespecífica añadiendo 300 µl de disolución de bloqueo (KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄·12H₂O 8,1 mM; NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; leche en polvo desnatada al 5%) a cada pocillo. (4) Sellar la placa e incubar a 37°C durante 1–2 horas. (5) Lavar 3 veces con tampón PBS-T y golpear la placa firmemente contra toallitas de papel limpias. (6) Diluir muestras de suero usando tampón PBS-T hasta 50 veces, 100 veces, 200 veces, 400 veces, 800 veces (realizar las diluciones en tubos de polipropileno) y añadir 100 µl por pocillo a la placa de ELISA. (7) Sellar la placa e incubar a una temperatura de 37°C durante 1 hora o a 4°C durante la noche. Lavar ≥ 3 veces con tampón PBS-T. Los lavados pueden lograrse eficazmente rellenando los geles con un pipeteador de múltiples canales. Para una rigurosidad aumentada, tras cada lavado, dejar la placa reposar brevemente, retirar el tampón y golpear las placas sobre toallitas de papel antes de volver a llenarlas. (8) Diluir el anticuerpo de cabra anti-rata marcado con HRP hasta su concentración óptima predeterminada en tampón PBS-T (habitualmente entre 1/5000-1/20000). Añadir 100 µl por pocillo. (9) Sellar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Lavar ≥ 5 veces con tampón PBS-T. (10) Para cada placa, mezclar 6 ml de reactivo de TMB A (EDTA-Na 0,5 mM; ácido cítrico 5 mM; glicerol al 10%; tetrametilbencidina al 0,04%) con 6 ml de reactivo de TMB B (acetato de sodio 165 mM; ácido cítrico 8,3 mM; H₂O₂ al 0,06% 30%) inmediatamente antes de su uso. Transferir 100 µl a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente

ES 2 694 667 T3

durante 30 min. Para detener la reacción, añadir 100 µl de disolución de parada (H₂SO₄ 2 M). (11) Leer la densidad óptica (DO) para cada pocillo con un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

- 5 El título de anticuerpos frente a OxOx alcanzó un pico a los 28 días tras la inyección (datos no mostrados). Los resultados en 28 días (figura 23) mostraron que el título de anticuerpos frente a OxOx-B5102 disminuyó significativamente cuando OxOx estaba pegilada, y disminuyó además cuando estaba pegilada con un tamaño grande de PEG. Había poco anticuerpo detectado contra OxOx-B5102 cuando OxOx estaba pegilada con PEG de 10 K, 20 K, 30 K y 40 K.

Lista de secuencias

<110> Nxt2b

5 <120> Método para producir oxalato oxidasas

<130> P013552PCT1

<160> 24

10 <170> BiSSAP 1,2

<210> 1

<211> 696

15 <212> DNA

<213> Beta vulgaris subsp. vulgaris

<220>

<221> fuente

20 <222> 1..696

<223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"

<400> 1

atgggtctttg caatgagctt tacttctcat atttacgtgg cttcggcctc tgatcctggt 60

ctcctacagg atttttgtgt ggggtgtaa at gaccctgatt cagcagtgtt tgtaa atgga 120

aaattctgca agaacc caaa agacgtgaca atcgacgatt tcttatacaa agggttta at 180

attccctcag acacaa caa cactcaaaga gcagaagcca cactagtaga tgtcaatcga 240

tttccagcac ttaacacatt aggtgtagcc atggctcgtg tagactttgc gtcctttggc 300

ctaaacacac ctcat tttgca ccctcgtgg tctgagatat tcgcggtcct agaggggact 360

ttatatgccg gcattgtcac caccgataat aagcttttcg acacgggtgtt gagaaagggt 420

gacatgattg ttttccctca aggctta atc cacttccagc ttaatccttg caagacagat 480

gctcttgcta ttgcctcttt tgggagccaa tttcctggac gagttaatgt tgcta atggt 540

gtctttggaa ctacgccaca aat tttggat gatgtactta cccaagcgtt tcaggtagat 600

aagatggtga ttgagcaact tcgatctcag ttttcaggtc caaacacatc aatcaact 660

25 ggaagatcta ttcttaaact cttaactgat gttgct 696

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

30 <213> Beta vulgaris subsp. Vulgaris

<400> 2

Met Val Phe Ala Met Ser Phe Thr Ser His Ile Tyr Val Ala Ser Ala

1 5 10 15

Ser Asp Pro Gly Leu Leu Gln Asp Phe Cys Val Gly Val Asn Asp Pro

20 25 30

Asp Ser Ala Val Phe Val Asn Gly Lys Phe Cys Lys Asn Pro Lys Asp

35 40 45

Val Thr Ile Asp Asp Phe Leu Tyr Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ser Asp

ES 2 694 667 T3

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

<210> 3
 <211> 648
 5 <212> DNA
 <213> Beta vulgaris subsp. vulgaris

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..648
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"

<400> 3

tctgatcctg	gtctcctaca	ggatTTTTgt	gtgggtgtaa	atgaccctga	ttcagcagtg	60
tttgtaaattg	gaaaattctg	caagaaccca	aaagacgtga	caatcgacga	tttcttatac	120
aaagggttta	atattccctc	agacacaaac	aacactcaaa	gagcagaagc	cacactagta	180
gatgtcaatc	gatttccagc	acttaacaca	ttaggtgtag	ccatggctcg	tgtagacttt	240
gcgtcctttg	gcctaaacac	acctcatttg	caccctcgtg	gttctgagat	attcgcggtg	300
ctagagggga	ctttatatgc	cggcattgtc	accaccgatt	acaagctttt	cgacacggtg	360
ttgagaaag	gtgacatgat	tgTTTTccct	caaggcttaa	tccacttcca	gcttaatctt	420
ggcaagacag	atgctcttgc	tattgcctct	tttgggagcc	aatttcctgg	acgagttaat	480
gttgctaattg	gtgtctttgg	aactacgcca	caaattttgg	atgatgtact	taccaagcg	540
tttcaggtag	atgagatggt	gattcagcaa	cttcgatctc	agttttcagg	tcaaacata	600
tcaatcaaca	ctggaagatc	tattcttaaa	ctcttaactg	atgttgct		648

ES 2 694 667 T3

<210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 5 <213> Beta vulgaris subsp. Vulgaris

<400> 4

```

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

10 <210> 5
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Beta vulgaris subsp. vulgaris

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..648
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"

20 <400> 5

ES 2 694 667 T3

tccgatcctg cacccttca agatttttgt attgctgtaa atgatcccaa ttctgcagtg 60
 cttgtgaatg gaaagctttg taagaaccca aaagaagtga caatagatga tttcttgtac 120
 aaagggttta atatacctgc agacacaaac aacactcaag gagcaagtgc cacactagtg 180
 gacattactc tattccctgc agttaacaca caaggagtct ccatggctcg tgtggacttt 240
 gcgccatttg gactaaacac ccctcattta catcctcgtg gctcagaggt tttcgcagtg 300
 atggaaggga ttatgtatgc tggttttgtg accactgatt ataagctcta tgatacaatt 360
 ataaaaaagg gtgatattat tgtgtttcca caaggcttaa ttcatttcca acttaatctt 420
 gggaagacag atgcttttagc aattgcctca tttgggagcc aaaatccagg gagaattaat 480
 atcgctgaca gtgtgtttgg tactactccg cgtgttctag atgatgtgct taccaaagga 540
 tttcaaatcg atgagttggt ggtcaagcaa cttcgttctc agttttctac tgataatata 600
 tcaacaagca ctggaaggtc atttttgaaa ttgctatctg aaacttat 648

5 <210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris subsp. Vulgaris

10 <400> 6

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

ES 2 694 667 T3

```

5 <210> 7
  <211> 639
  <212> ADN
  <213> Musa acuminata

  <220>
  <221> fuente
  <222> 1..639
  <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Musa acuminata"

10 <400> 7

   tttgatccga gtcctctcca agacttttgc gttgctgact acgactccaa cgtgtttgtg      60
   aacggattcg cctgcaagaa agctaaggat gtcacggcag atgacttcta cttcaccggc      120
   ttagacaagc ccgcgagcac cgccaacgag cttggcgcaa acatcactct cgtcaacgtg      180
   gaacgactcc caggcctcaa ctcccttggc gtcgccatgt ctcgcatcga ctacgcgccc      240
   ttcggtctca accctcctca ctcgcatcca cgatcgtcgg agatactgca cgtggcggaa      300
   ggaacgctct acgccggctt cgtcacctcc aacacggaaa acggcaacct tctcttcgct      360
   aagaagctga agaagggcga cgcgtttgtg ttccccaggg gcctcataca cttccagttc      420
   aacatcgggg acaccgatgc ggtggcgttc gctaccttcg gcagccagag cccgggtctc      480
   gtcaccaccg ccaacgcact gttcggatcg aagccgccca tcgctgatta cattcttgcc      540
   caggccgtgc agcttagcaa gacgaccgtg ggctggcttc agcagcagca gtggttgga      600
15  atcgctcaag aatatggaca acgcttagtt caagctaat      639

  <210> 8
  <211> 213
  <212> PRT
  <213> Musa acuminata

  <400> 8

```

ES 2 694 667 T3

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

<210> 9

<211> 639

5 <212> ADN

<213> Beta vulgaris subsp. vulgaris

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..639

<223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"

<400> 9

atggctcccc tactctacct tgtagtattc ttgcttgctc cttttctctc ccatgctgcg 60

gatccccgac ctttgctaga tttttgtgta gcggacctta atgcctctcc ctcatttgct 120

aatttcctt gcaaacaac ctcaaagtg acctctgaag atttcttctt tgatgggtt 180

atgaatgagg gaaacacatc aaactcgttt ggatcaaggg tcacacccgg aaacgtcctc 240

acatttcctg cccttaatat gctcgggatt tcaatgaatc gggttgatct tgctgtggat 300

gggatgaacc cgccccattc ccaccacga gcaagtgaga gcggtgtggt gatgaagggg 360

agagttctag tagggttcgt aaccacgggg aatgtgtact attcaaaggt gttggttcca 420

ggacagatgt ttgtaatccc aagggggttg gttcattttc aaaagaatgt tggacaaaat 480

aaggcactca tcattacagc tttcaatagt cagaatccag gagtagtggt attatcctca 540

accctgtttg gtacaaaacc ttcaattcca gatgatgttt taagccaaac tttcctagtg 600

15 gaccagagca ttgtcgaagg aataaaatcc aacttttga 639

ES 2 694 667 T3

<210> 10
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris subsp. Vulgaris

5

<400> 10

```

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

10 <210> 11
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Beta vulgaris subsp. vulgaris

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..660
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"

20 <400> 11

atggaagtgcg tcgcagctgt atcttttctg gccgtgttat tggctctggt ttcccctgcc 60
ctcgccaatg atcctgatat gctccaagat gtttgtgtcg ctgattccac ctctggagtg 120
aaattgaatg gatttgcacg caaggatgca gcaagcatta caccagaaga cttcttcttt 180
gctggaatat ccaaaccggg aatgacaaac aatacaatga aatccctagt aaccggagct 240
aacgtcgaaa agataccggg tttaaacaca ctcgagtggt ccatgggtcg tatcgacttc 300
ggcccagtggt gtcttaaccc acctcacact caccacagag ccacagaaat ggtctttgtg 360
ttatatggag aattggacgt tggtttctta actacttcta ataagctcat ttctaagcat 420
attaaaactg gtgaaacttt tgtttttcct agaggggttag tccactttca gaaaaataat 480
ggggataaac ctgctgcttt agtcactgct tttaatagtc agttgcctgg cacccaatca 540
atagctgcca cgttgtttac gtcgacccca cctgttccag ataatgtttt aactatgact 600
ttccaagtgcg gtactaaaca agtccagaag atcaaggcta ggctcgctcc taagaagtaa 660

<210> 12
<211> 219
5 <212> PRT
<213> Beta vulgaris subsp. Vulgaris

<400> 12

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

<210> 13
10 <211> 669

ES 2 694 667 T3

<212> ADN
 <213> Beta vulgaris subsp. vulgaris

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..669
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"

10 <400> 13

```

atggcggtctg tttgggtagt cttgggtggtg ctacgcggcgg cttttgctgt tgggggtcttt      60
gccagcgatc ctgatatgct tcaagatggt tgtgttgctg atcgtacatc tggaatatta      120
gtgaatggat tcacatgtaa aaatatgacc atgataaccc ctgaagactt cttcttcacc      180
ggaatttcac aaccaggcca aatcacaaat aaaatccttg gttctcgagt caccggagcgg      240
aatgtgcagg acatccctgg tctcaacacc ttgggagtct cgatggctcg tgtcgacttt      300
actccctacg gtctaaaccc acctcacatt caccctagaa tcgtccaccc tcgtgccact      360
gaaatgatct atgttcttaa gggatgaattg tacgttggtt ttataacgac cgacaataag      420
ctcatttcca aggttgtaa agctggagaa gtatttggtt tccctagagg tttggctcac      480
tttcagaaaa acatggtgaa atatccagct gctgcattag ctgccttcaa cagccaactt      540
ccaggcactc aacaatttgc agctgctctc tttacttcca atcctcctgt gtctaataat      600
gtgttggctc aggcttttaa cattgacgaa cacaatgtca aaaagattag ggctggcctt      660
actccatag                                     669
  
```

15 <210> 14
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris subsp. Vulgaris

<400> 14

```

Met Ala Ala Val Trp Val Val Leu Val Val Leu Ala Ala Ala Phe Ala
1          5          10          15
Val Gly Val Phe Ala Ser Asp Pro Asp Met Leu Gln Asp Val Cys Val
20          25          30
Ala Asp Arg Thr Ser Gly Ile Leu Val Asn Gly Phe Thr Cys Lys Asn
35          40          45
Met Thr Met Ile Thr Pro Glu Asp Phe Phe Phe Thr Gly Ile Ser Gln
50          55          60
Pro Gly Gln Ile Thr Asn Lys Ile Leu Gly Ser Arg Val Thr Gly Ala
65          70          75          80
Asn Val Gln Asp Ile Pro Gly Leu Asn Thr Leu Gly Val Ser Met Ala
85          90          95
Arg Val Asp Phe Thr Pro Tyr Gly Leu Asn Pro Pro His Ile His Pro
100         105         110
Arg Ala Thr Glu Met Ile Tyr Val Leu Lys Gly Glu Leu Tyr Val Gly
115         120         125
Phe Ile Thr Thr Asp Asn Lys Leu Ile Ser Lys Val Val Lys Ala Gly
130         135         140
  
```


ES 2 694 667 T3

Glu	Val	Phe	Val	Phe	Pro	Arg	Gly	Leu	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Asn	Met
145					150					155					160
Leu	Lys	Tyr	Pro	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Phe	Asn	Ser	Gln	Leu	Pro
				165					170						175
Gly	Thr	Gln	Gln	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Asn	Pro	Pro	Val
			180						185				190		
Ser	Asn	Asp	Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Phe	Asn	Ile	Asp	Glu	His	Asn	Val
		195					200					205			
Lys	Lys	Ile	Arg	Ala	Gly	Leu	Thr	Pro							
	210					215									

<210> 15
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Musa acuminata

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..660
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Musa acuminata"

10

<400> 15
 atggagtcgc actacacgaa gagaccattc ctctcttttc tctccttcac cgtcctcctc 60
 gtgttgatcc gcgctgacct tgatcctctc caggacttct gcgtcgccga cctcggagct 120
 actgtggctc tcaatgggtt cccgtgcaag cccgcgtccg gagtcacgtc cgacgacttc 180
 ttcttcgccc gactgtccag ggagggcaac accagcaata tcttcgggtc caacgtgacc 240
 aacgccaaca tgctcagctt cccggggctc aacaccctcg gcgtctccat gaaccgcgctc 300
 gacgtcgccc ccggcgccac caaccgccc cacagccacc cgagggctac cgagctcatc 360
 atcctcctca agggccggct gctggtgggg ttcattcagca ccagtaacca gttcttctcc 420
 aaggtcttga accccggcga gatgttcgtg gtgcccgaag ggctcatcca cttccagtac 480
 aacgtcggca aggagaaggc gctcgcctac accaccttcg acagccagct ccccggagta 540
 gtgatcgcct ccaccaccct gttcgcctcg aatccggcga ttcccagcga tgtgctggcc 600
 aaagcttttc aggtggacgc gaaggtcgtc gctctcatca agtccaagtt tgagagataa 660

15

<210> 16
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Musa acuminata

20

<400> 16

ES 2 694 667 T3

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

5 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 510F"/organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 17
 ccgctcgaga aaagatctga tctgggtctc ctacag 36

20 <210> 18
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..37
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador510R"/organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 18
 aaatatgagg ccgctcaagc aacatcagtt aagagtt 37

35 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 694 667 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..33
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 560F"/organismo="Secuencia artificial"
 <400> 19
 10 ccgctcgaga aaagatccga tctgcaccc ctt 33
 <210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 5601R"/organismo="Secuencia artificial"
 20 <400> 20
 aaatatgCGG ccgctcaata agttcagat agcaatttc 39
 <210> 21
 25 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 30640F"/organismo="Secuencia artificial"
 <400> 21
 35 ccgctcgaga aaagattga tccgagtcct ctcca 35
 <210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..38
 45 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 30640R"/organismo="Secuencia artificial"
 <400> 22
 aaatatgCGG ccgctcaatt agcttgaact aagcgttg 38
 50 <210> 23
 <211> 5900
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..5900
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="secuencia de plásmido pET-32a(+)"/organismo="Secuencia artificial"
 60 <400> 23

ES 2 694 667 T3

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcggggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcgccgt cctttcgcct tcttcacctc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcgaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840
 tattgacgcc gggcaagagc aactcggctc cgcatacac tattctcaga atgacttggg 900
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
 cagtgctgcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080
 tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
 tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260
 ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgcctgaga taggtgcctc 1440
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaactctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680
 accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaagg 1740
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860

ES 2 694 667 T3

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920
 accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg 1980
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100
 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220
 cgccagcaac ggggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt 2280
 ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcaggtca gtgagcggag aagcgggaaga 2400
 gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatatatgg 2460
 tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct 2580
 gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700
 catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcacccgcy tccagctcgt 2760
 tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820
 ttttttctg tttggctact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
 tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacggg tactgatgat gaacatgccc 2940
 ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaaac tggcgggatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
 aatcactca gggatcaatgc cagcgttcg ttaatacaga tgtaggtggt ccacagggta 3060
 gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggg gcagggcgct gacttccgcy 3120
 tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttggtgct caggctcgag 3180
 acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgat cggtgattca ttctgctaac 3240
 cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300
 cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttgggtggcgg 3360
 gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420
 cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggg cctcgccgaa aatgaccag agcgtgccc 3480
 gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca 3540
 tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggctcgag 3600
 atcccgggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 3660
 tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720

ES 2 694 667 T3

gcggtttgcg tattgggagc caggggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780
 tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcgggccac gctggtttgc 3840
 cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900
 tcggtatcgt cgtatcccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960
 atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcggttgcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020
 atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080
 tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140
 cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc 4200
 aatgcgacca gatgctccac gccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260
 ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320
 tccacagcaa tggcatcctg gtcacccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380
 tgcgcgagaa gattgtgcac cgcgcgttta caggcttcga cgcgcgttcg ttctaccatc 4440
 gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500
 gacggcgcggt gcagggccag actggaggtg gcaacgcca tcagcaacga ctgtttgccc 4560
 gccagttggt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact 4620
 ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680
 taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtha ctggttttcac attcaccacc 4740
 ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800
 atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860
 tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920
 gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat 4980
 gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040
 aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100
 cgatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160
 ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat gagcgataaa 5220
 attattcacc tgactgacga cagttttgac acggatgtac tcaaagcgga cggggcgatc 5280
 ctcgtcgatt tctgggcaga gtggtgcggt ccgtgcaaaa tgatcgcccc gattctggat 5340
 gaaatcgctg acgaatatca gggcaaacctg accggtgcaa aactgaacat cgatcaaaac 5400
 cctggcactg cgccgaaata tggcatccgt ggtatcccga ctctgctgct gttcaaaaac 5460
 ggtgaagtgg cggcaaccaa agtgggtgca ctgtctaaag gtcagttgaa agagttcctc 5520
 gacgctaacc tggccggttc tggttctggc catatgcacc atcatcatca tcattcttct 5580
 ggtctggtgc cacgcgggtc tggtatgaaa gaaaccgctg ctgctaaatt cgaacgccag 5640

ES 2 694 667 T3

cacatggaca gccagatct gggtagcgac gacgacgaca aggccatggc tgatatcgga 5700
 tccgaattcg agctccgtcg acaagcttgc ggccgcactc gagcaccacc accaccacca 5760
 ctgagatccg gctgctaaca aagccccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga 5820
 gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa 5880
 aggaggaact atatccggat 5900

<210> 24
 <211> 5423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..5423
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="plásmido pAT"/organismo="Secuencia artificial"

10

<400> 24
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctcgt cctttcgttt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgacct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggctatttgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
 gagtattcaa catttccgtg tcgcocttat tccctttttt gcggcatttt gccttctgt 660
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840
 tattgacgcc gggcaagagc aactcggctc ccgcatacac tattctcaga atgacttgg 900
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
 cagtgctgcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1080
 tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

15

ES 2 694 667 T3

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260
 ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500
 aaaacttcat tttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
 aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680
 accgctacca gcggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt 1740
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860
 agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100
 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggttcgcca 2160
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctogtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccctttgc tggccttttg ctcacatggt 2280
 ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga 2340
 taccgctcgc gcgagccgaa cgaccgagcg cagcaggtca gtgagcgagg aagcgggaaga 2400
 gcgcctgatg cggtatcttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg 2460
 tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcgc aacaccgcct gacgcgcctt 2580
 gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700
 catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcacccgcg tccagctcgt 2760
 tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggcatg ttaagggcgg 2820
 ttttttctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
 tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940
 ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
 aaatcactca gggccaatgc cagcgccttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060

ES 2 694 667 T3

gccagcagca tcctgcatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120
tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttggtgct caggtcgcag 3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300
cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttgggtggcgg 3360
gaccagtgac gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420
cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggg cctcgcggaa aatgaccag agcgctgccg 3480
gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca 3540
tgccccgcg ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag 3600
atcccgggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt 3660
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaataaat cggccaacgc gcggggagag 3720
gcggtttgcg tattgggcg cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780
tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcgggccac gctggtttgc 3840
cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900
tcggtatcgt cgtatcccac taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960
atggcgcgca ttgcgccag cgccatctga tcggttgcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020
atgccctcat tcagcattg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080
tcccgttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga 4140
cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgacct 4200
aatgcgacca gatgctccac gccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260
ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320
tccacagcaa tggcatcctg gtcacccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380
tgccgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc 4440
gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500
gacggcgcgt gcagggccag actggaggtg gcaacgcaa tcagcaacga ctgtttgccc 4560
gccagttggt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgcatcgc cgcttccact 4620
ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680
taagagacac cggcactctc tgcgacatcg tataacgta ctggtttcac attcaccacc 4740
ctgaattgac tctcttccg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800
atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860
tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920

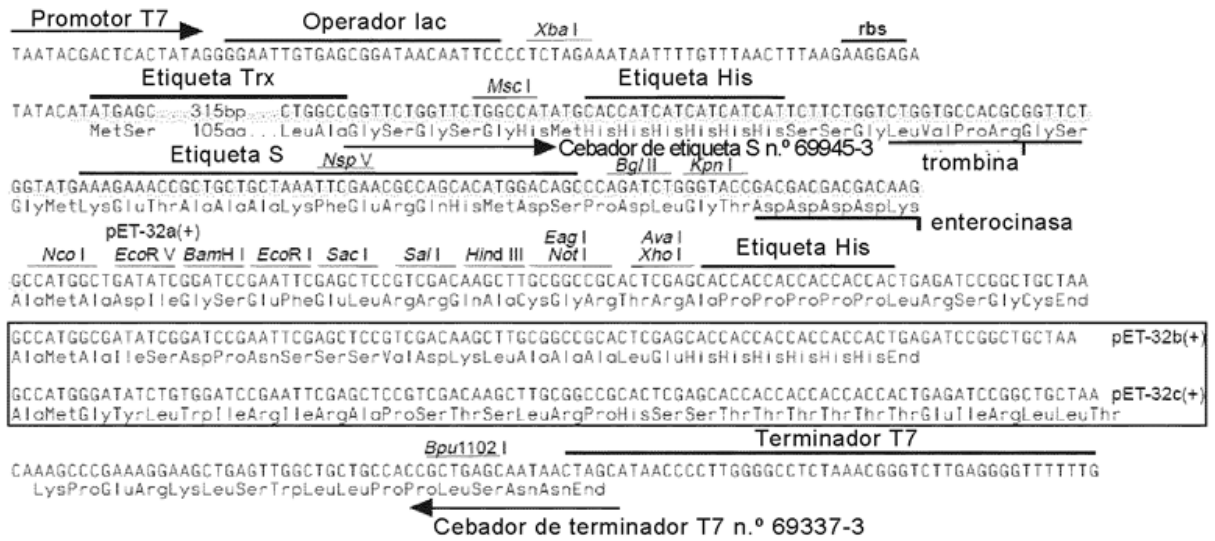
ES 2 694 667 T3

gccaacagt	ccccggcca	cggggcctgc	caccatacc	acgccgaaac	aagcgctcat	4980
gagcccgaag	tggcgagccc	gatcttccc	atcggatgatg	tcggcgatat	aggcgccagc	5040
aaccgcacct	gtggcgccgg	tgatgccggc	cacgatgcgt	ccggcgtaga	ggatcgagat	5100
cgatctcgat	cccgcgaaat	taatacgact	cactataggg	gaattgtgag	cggataacaa	5160
ttcccctcta	gaaataattt	tgtttaactt	taagaaggag	atatacccat	ggctgatatc	5220
ggatccgaat	tcgagctccg	tcgacaagct	tcgggccgca	ctcgagcacc	accaccacca	5280
ccactgagat	ccggctgcta	acaagccccg	aaaggaagct	gagttggctg	ctgccaccgc	5340
tgagcaataa	ctagcataac	cccttggggc	ctctaaacgg	gtcttgaggg	gttttttgct	5400
gaaaggagga	actatatccg	gat				5423

REIVINDICACIONES

- 5 1. Oxalato oxidasa recombinante que tiene una identidad de secuencia de al menos el 60% con los polipéptidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, o una identidad de secuencia de al menos el 99% con el polipéptido de SEQ ID NO: 8, y en la que la oxalato oxidasa recombinante puede degradar oxalato con una actividad relativa de al menos el 20% a pH 7,5, en la que se calcula la actividad relativa como (actividad observada (pH 7,5)/actividad máx.) * 100%.
- 10 2. Oxalato oxidasa recombinante según la reivindicación 1 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% con los polipéptidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, o una identidad de secuencia del 100% con el polipéptido de SEQ ID NO: 8.
- 15 3. Oxalato oxidasa recombinante según la reivindicación 1 ó 2, que tiene una actividad relativa de al menos el 60%.
4. Oxalato oxidasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una actividad relativa de al menos el 80%.
- 20 5. Oxalato oxidasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma pegilada.
6. Oxalato oxidasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como medicamento.
- 25 7. Oxalato oxidasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con oxalato en exceso, en la que la enfermedad se selecciona de hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria secundaria, autismo, vulvodinia, oxalosis asociada con enfermedad renal en fase terminal, trastornos de la conductancia cardíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis, urolitiasis, sarcoidosis, asma, EPOC, fibromialgia, síndrome de Zellweger y cirugía bariátrica.
- 30 8. Polinucleótido aislado que codifica para la oxalato oxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 35 9. Polinucleótido según la reivindicación 8 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 60% con los nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, o una identidad de al menos el 99% con los nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
- 40 10. Polinucleótido según la reivindicación 8 ó 9, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% con los nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, o una identidad de secuencia del 100% con los nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
- 45 11. Vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
- 50 12. Célula huésped recombinante transformada con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
- 55 13. Método para producir una oxalato oxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende cultivar la célula huésped recombinante según la reivindicación 12 en condiciones adecuadas para la expresión de la oxalato oxidasa.
- 60 14. Célula vegetal, parte de planta o planta transgénica transformada con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
15. Composición farmacéutica que comprende una oxalato oxidasa recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
16. Oxalato oxidasa recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de hiperoxaluria primaria, hiperoxaluria secundaria, trastorno del espectro de Zellweger o insuficiencia renal crónica mediante la administración de la oxalato oxidasa recombinante por vía parenteral a la circulación sistémica para degradar oxalato en el cuerpo.

Figura 1



Modificaciones del vector pET-32 para generar el plásmido pAT.
 La secuencia de ADN resaltada en amarillo se delecionó en un vector pET-32 para generar el plásmido pAT.

Figura 2

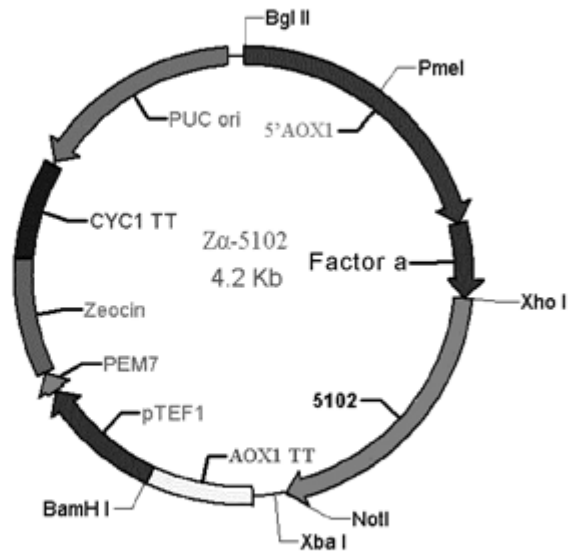


Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia Zα-5102*

Figura 3

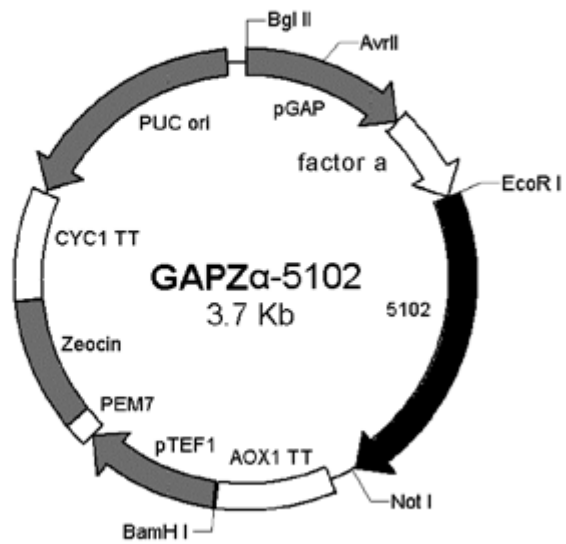


Diagrama esquemático del plásmido de expresión en *Pichia GAPZα-5102*

Figura 4

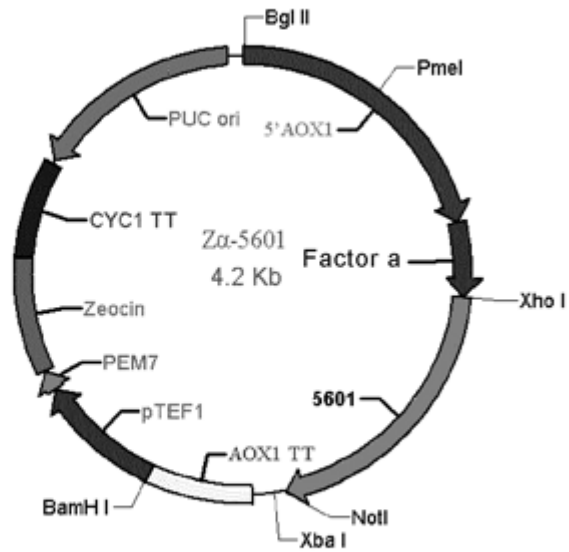


Diagrama esquemático del plásmido de expresión en Pichia Zα-5601

Figura 5

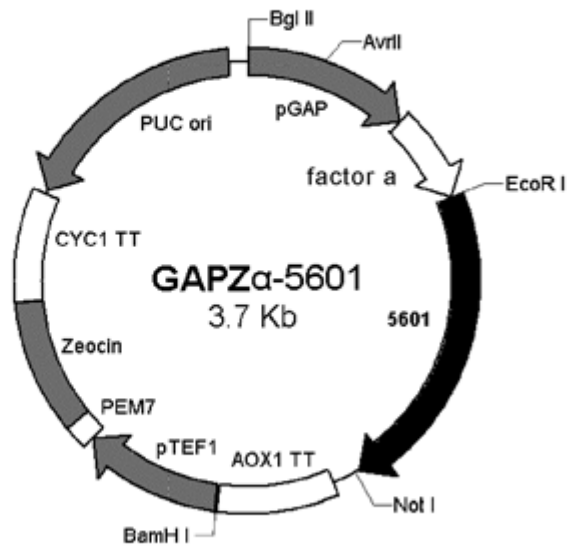


Diagrama esquemático del plásmido de expresión en Pichia GAPZα-5601

Figura 6

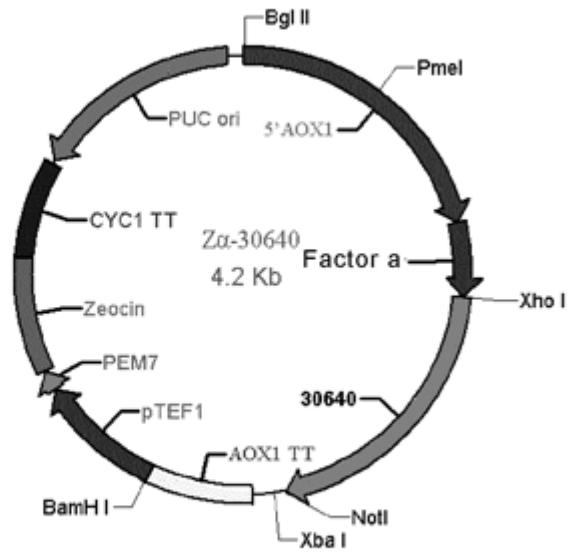


Diagrama esquemático del plásmido de expresión en Pichia Zα-30640

Figura 7

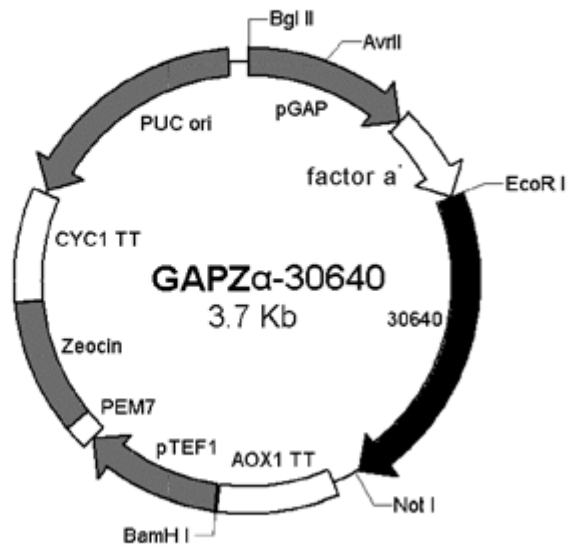
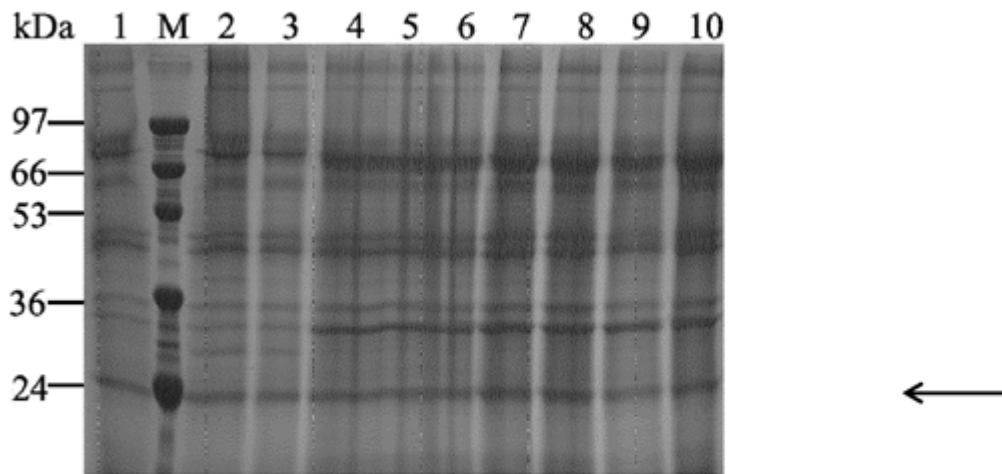


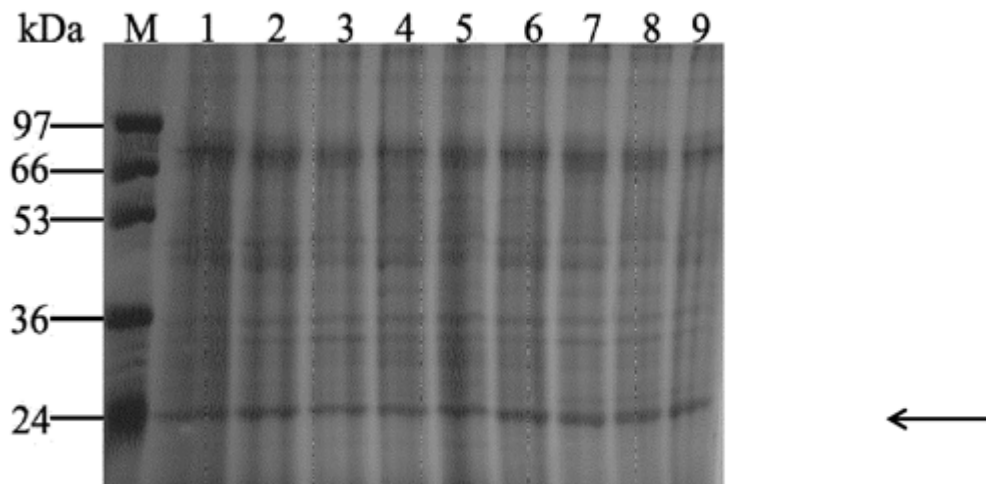
Diagrama esquemático del plásmido de expresión en Pichia GAPZα-30640

Figura 8



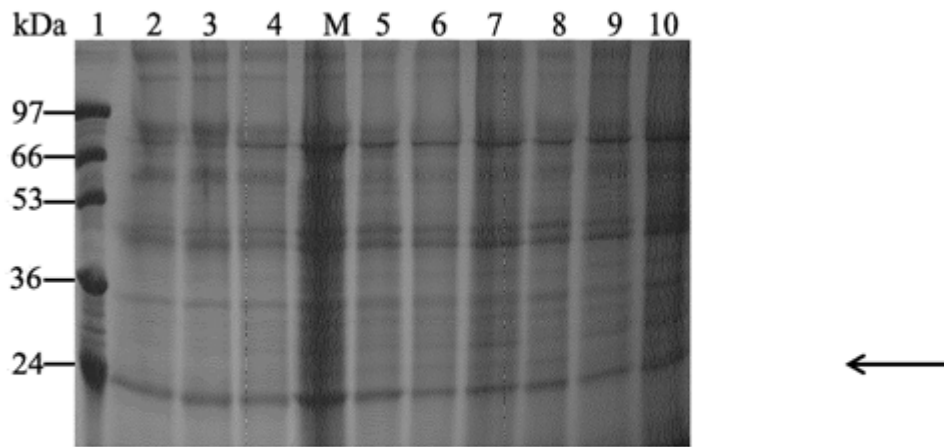
Análisis SDS-PAGE de la expresión de OxO de remolacha en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; M: marcador de proteína; carriles 1-10, X-33(ZαA-5102).

Figura 9



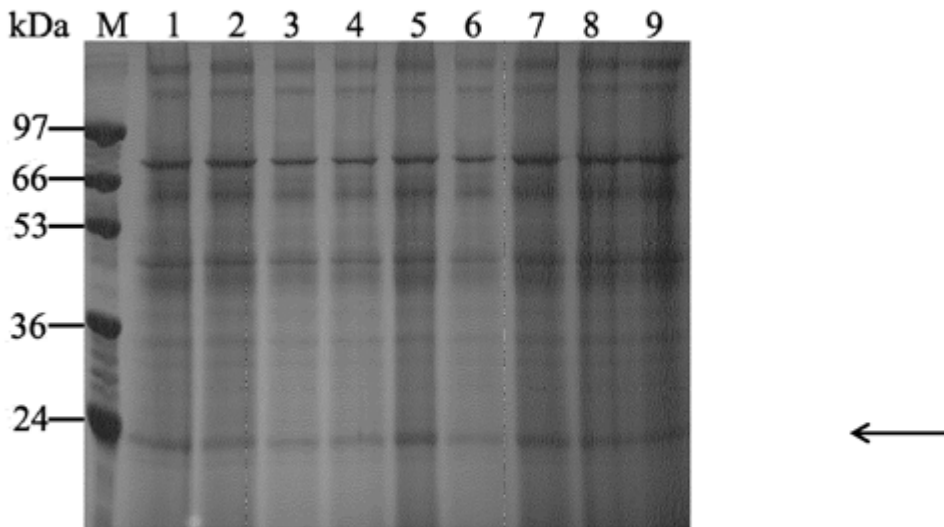
Análisis SDS-PAGE de la expresión de OxO de remolacha en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; carriles 1-9, X-33(Zα-5601).

Figura 10



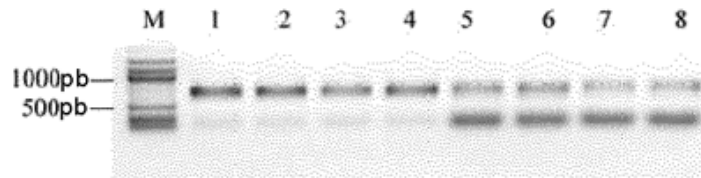
Análisis SDS-PAGE de la expresión de OxO de plátano en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; carriles 1-10, X-33(Z α A-30640)

Figura 11



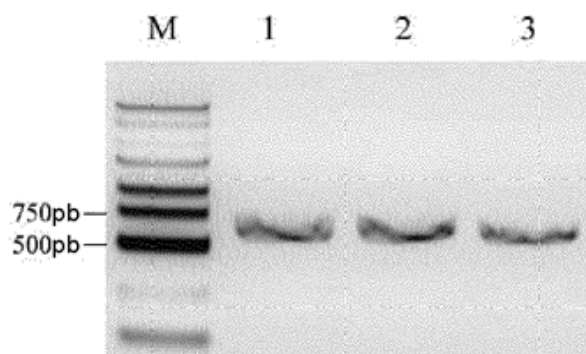
Análisis SDS-PAGE de la expresión de OxO de remolacha en *P. pastoris*. M: marcador de proteína; carriles 1-9, X-33(GAPZ α -5601)

Figura 12



Amplificación por PCR de los genes de OxO de la biblioteca de ADNc de remolacha azucarera. M. Marcador de ADN; carril 1-4, 5601; carril 5-8, 5102

Figura 13



Amplificación por PCR del gen de OxO de la biblioteca de ADNc de plátano. M. Marcador de ADN; carril 1-3, 30640.

Figura 14

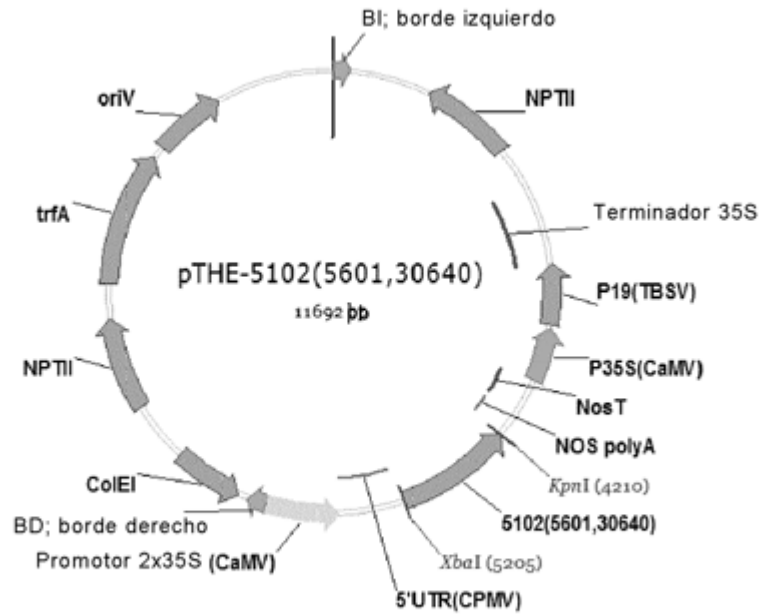
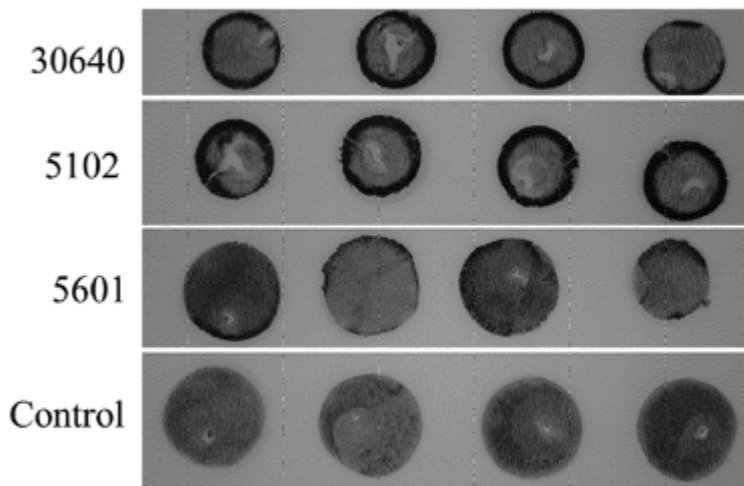


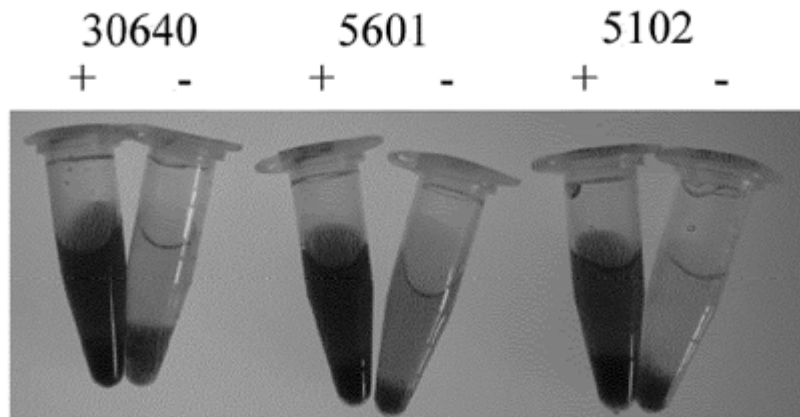
Diagrama esquemático del vector de expresión vegetal

Figura 15



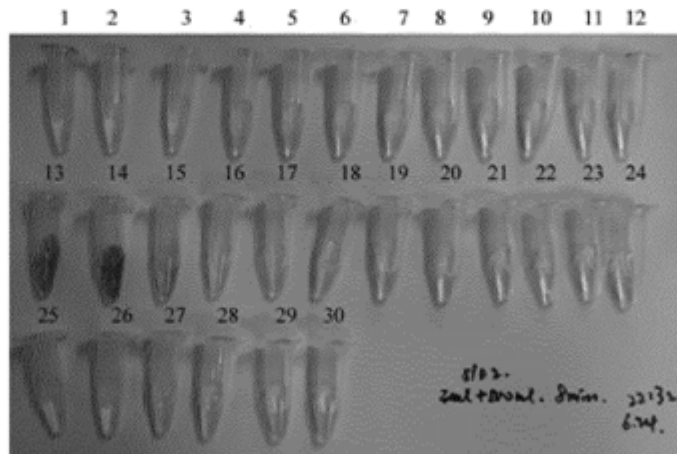
Ensayo histoquímico de actividad oxalato oxidasa tras incubación durante la noche en tampón histológico de OxOx

Figura 16



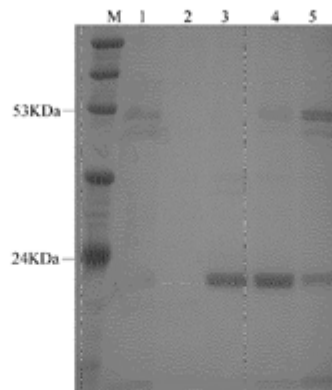
Detección de la actividad OxO de la fracción de pared celular purificada de plantas de guisante mediante ensayo colorimétrico, pH 7,4. El tubo izquierdo contenía ácido oxálico 2 mM; el tubo derecho no contenía ácido oxálico.

Figura 17



Detección de la actividad OxOx de las fracciones 5102 purificadas de plantas de guisante.

Figura 18



Purificación de 5102 de OxOx de remolacha recombinante.

M, marcador de proteína; carril 1, muestra antes de purificarse mediante columna Q Sepharose; carril 2, la muestra de lavado; carril 3; muestra eluida n.º 13; carril 4, muestra eluida n.º 14; carril 5, muestra eluida n.º 15.

Figura 19

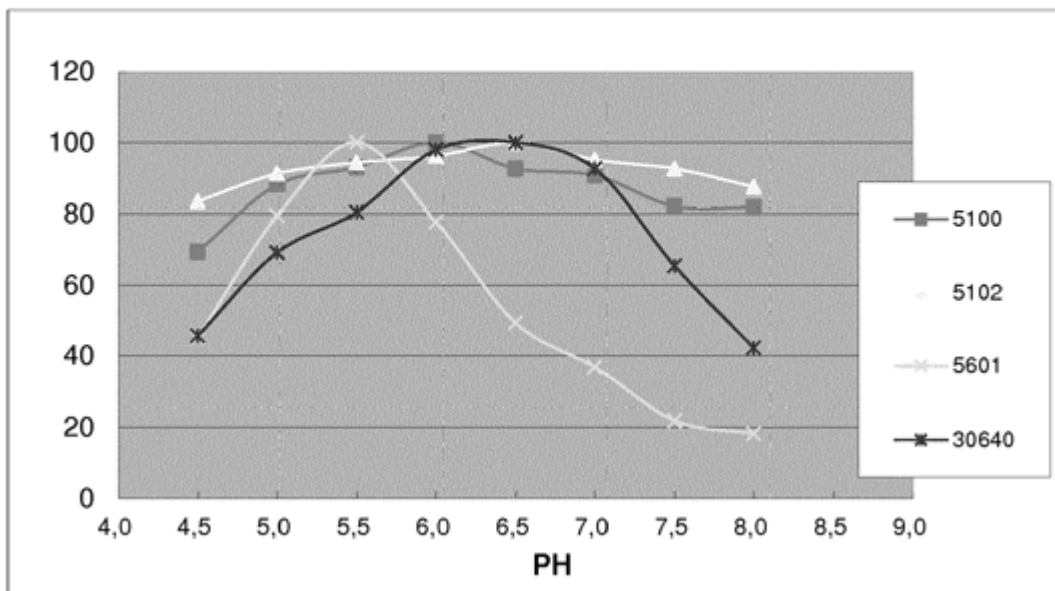


Figura 20

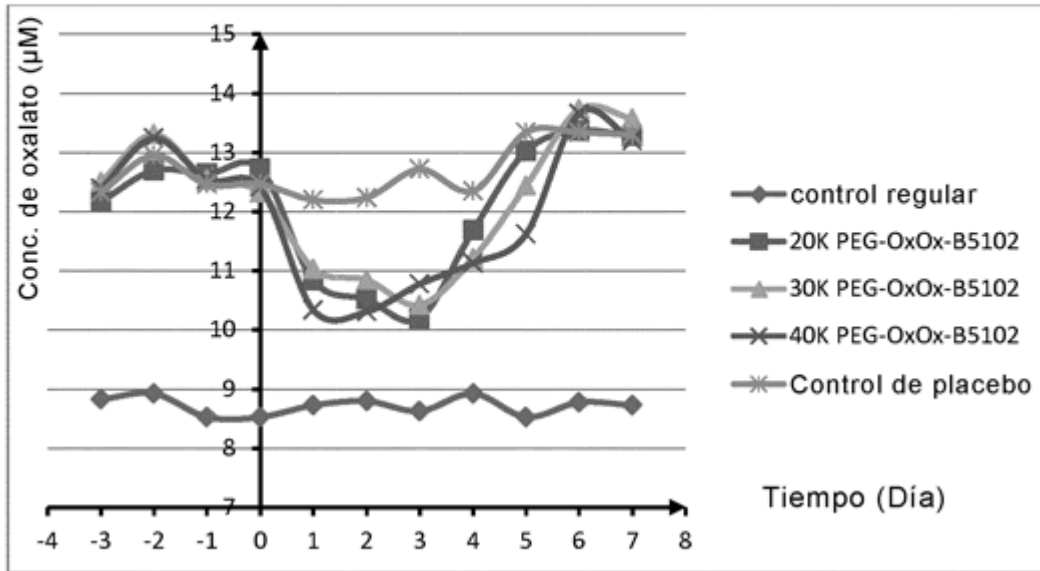


Figura 21

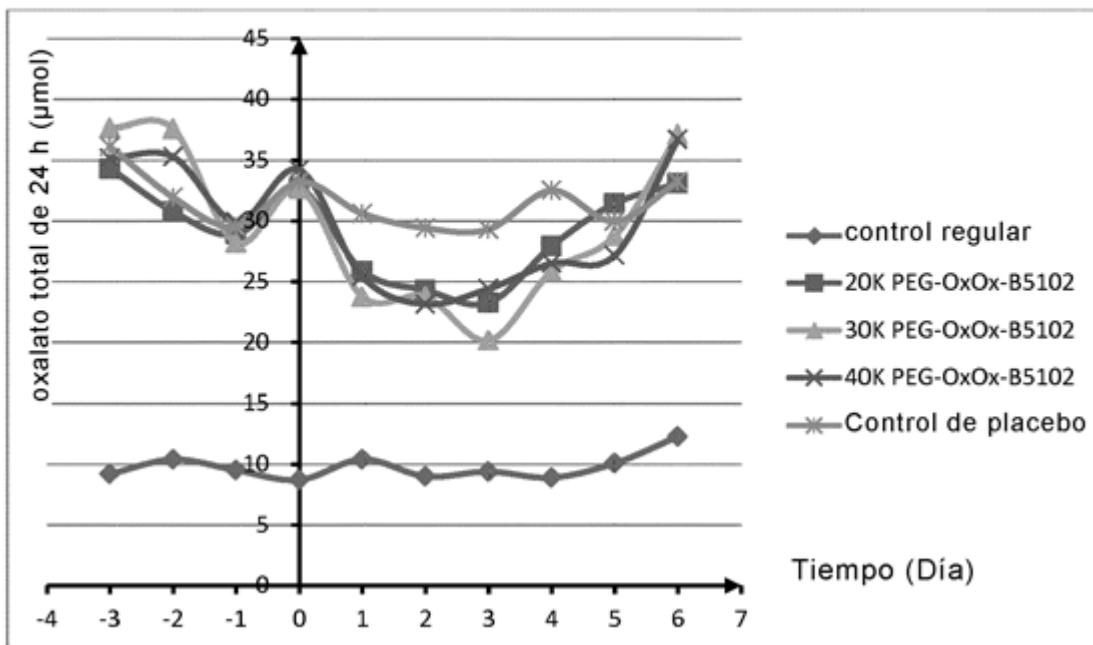


Figura 22

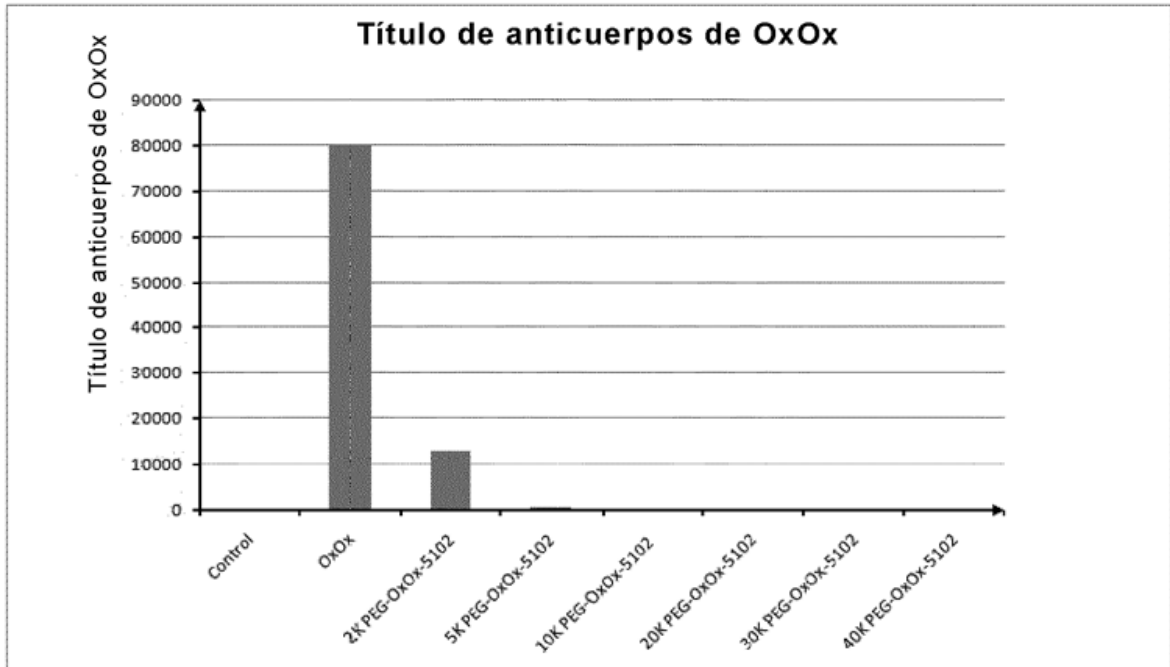


Figura 23

Lista de secuencias

- 5 <110> Nxt2b
 <120> Método para producir oxalato oxidasas
- 10 <130> P013552PCT1
 <160> 24
 <170> BiSSAP 1,2
- 15 <210> 1
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> Beta vulgaris subsp. vulgaris
- 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..696
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="Beta vulgaris subsp. vulgaris"
- 25 <400> 1
 atggctctttg caatgagctt tacttctcat atttacgtgg ctcggcctc tgatcctggt 60

 ctctacagg attttgtgt gggtgtaa at gaccctgatt cagcagtgtt tgtaa atgga 120

 aaattctgca agaacc caaa agacgtgaca atcgacgatt tcttatacaa agggttta at 180

 attccctcag acacaa acaa cactcaaaga gcagaagcca cactagtaga tgtaaatcga 240

 ttccagcac ttaacacatt aggtgtagcc atggctcgtg tagactttgc gtcctttggc 300

ES 2 694 667 T3

ctaaacacac ctcaattgca cctcgtggt tctgagatat tcgcggtcct agaggggact 360

ttatatgccg gcattgtcac caccgataat aagcttttcg acacgggtgt gagaaagggt 420

gacatgattg tttccctca aggcttaac cacttccagc ttaatcttgg caagacagat 480

gctcttgcta ttgcctcttt tgggagccaa tttctggac gagttaatgt tgctaattgt 540

gtctttggaa ctacgccaca aattttggat gatgtactta cccaagcgtt tcaggtagat 600

aagatgggta ttgagcaact tcgatctcag ttttcaggtc caaacacatc aatcaacact 660

ggaagatcta ttcttaaact cttaactgat gttgct 696

<210> 2

<211> 232

5 <212> PRT

<213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<400> 2

Met Val Phe Ala Met Ser Phe Thr Ser His Ile Tyr Val Ala Ser Ala

1 5 10 15

Ser Asp Pro Gly Leu Leu Gln Asp Phe Cys Val Gly Val Asn Asp Pro

20 25 30

Asp Ser Ala Val Phe Val Asn Gly Lys Phe Cys Lys Asn Pro Lys Asp

35 40 45

Val Thr Ile Asp Asp Phe Leu Tyr Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ser Asp

50 55 60

Thr Asn Asn Thr Gln Arg Ala Glu Ala Thr Leu Val Asp Val Asn Arg

65 70 75 80

Phe Pro Ala Leu Asn Thr Leu Gly Val Ala Met Ala Arg Val Asp Phe

85 90 95

Ala Ser Phe Gly Leu Asn Thr Pro His Leu His Pro Arg Gly Ser Glu

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

<210> 3
 <211> 648
 5 <212> DNA
 <213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..648
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Beta vulgaris subsp. vulgaris*"

<400> 3
 tctgatcctg gtctcctaca ggattttgt gtgggtgtaa atgaccctga ttcagcagtg 60

 ttgtaaatg gaaaattctg caagaacca aaagacgtga caatcgacga tttcttatac 120

 aaagggttta atattccctc agacacaaac aacactcaaa gagcagaagc cacactagta 180

gatgtcaatc gatttccagc acttaacaca ttaggtgtag ccatggctcg ttagacttt 240
 gcgtccttg gcctaaacac acctcattg caccctcgtg gttctgagat attcgcggtg 300
 cttagagggga ctttatatgc cggcattgac accaccgatt acaagctttt cgacacggg 360
 ttgagaaagg gtgacatgat tgtttccct caaggcttaa tccactcca gcttaattt 420
 ggcaagacag atgctctgac tattgcctct tttgggagcc aattcctgg acgagtaat 480
 gttgctaag gtgtcttgg aactacgcca caaatttgg atgatgtact tacccaagcg 540
 ttcaggtag atgagatggt gattcagcaa ctctgatctc agtttcagg tcaaacata 600
 tcaatcaaca ctggaagatc tattcttaa ctcttaactg atgttgct 648

<210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

5

<400> 4
 Ser Asp Pro Gly Leu Leu Gln Asp Phe Cys Val Gly Val Asn Asp Pro
 1 5 10 15
 Asp Ser Ala Val Phe Val Asn Gly Lys Phe Cys Lys Asn Pro Lys Asp
 20 25 30
 Val Thr Ile Asp Asp Phe Ile Tyr Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ser Asp
 35 40 45
 Thr Asn Asn Thr Gln Arg Ala Glu Ala Thr Leu Val Asp Val Asn Arg
 50 55 60
 Phe Pro Ala Leu Asn Thr Leu Gly Val Ala Met Ala Arg Val Asp Phe
 65 70 75 80
 Ala Ser Phe Gly Leu Asn Thr Pro His Leu His Pro Arg Gly Ser Glu
 85 90 95

Ile Phe Ala Val Leu Glu Gly Thr Leu Tyr Ala Gly Ile Val Thr Thr
 100 105 110
 Asp Asn Lys Leu Phe Asp Thr Val Leu Arg Lys Gly Asp Met Ile Val
 115 120 125
 Phe Pro Gln Gly Leu Ile His Phe Gln Leu Asn Leu Gly Lys Thr Asp
 130 135 140
 Ala Leu Ala Ile Ala Ser Phe Gly Ser Gln Phe Pro Gly Arg Val Asn
 145 150 155 160
 Val Ala Asn Gly Val Phe Gly Thr Thr Pro Gln Ile Leu Asp Asp Val
 165 170 175
 Leu Thr Gln Ala Phe Gln Val Asp Glu Met Val Ile Gln Gln Leu Arg
 180 185 190
 Ser Gln Phe Ser Gly Pro Asn Thr Ser Ile Asn Thr Gly Arg Ser Ile
 195 200 205
 Leu Lys Leu Leu Thr Asp Val Ala
 210 215

<210> 5
 <211> 648
 5 <212> ADN
 <213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..648
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Beta vulgaris subsp. vulgaris*"

<400> 5
 tccgatcctg cacccttca agatthttgt attgctgtaa atgatcccaa ttctgcagtg 60

 ctgtgaaatg gaaagctttg taagaaccca aaagaagtga caatagatga ttctgttac 120

 aaagggttta atatacctgc agacacaaac aacctcaag gagcaagtgc cacactagtg 180

 gacattactc tattccctgc agttaacaca caaggagtct ccatggctcg tgtggacttt 240

ES 2 694 667 T3

gcgccatttg gactaaacac ccctcattta catcctcgtg gctcagaggt ttcgcagtg 300

atggaagggga ttatgtatgc tggttttgtg accactgatt ataagctcta tgatacaatt 360

ataaaaaagg gtgatattat tgtgtttcca caaggctcaa ttcatttcca acttaatctt 420

gggaagacag atgcttttagc aattgcctca ttggggagcc aaaatccagg gagaattaat 480

atcgctgaca gtgtgtttgg tactactccg cgtgttctag atgatgtgct taccaaagga 540

ttcaaatcg atgagtgtt ggtaagcaa cttcgttctc agttttctac tgataatata 600

tcaacaagca ctggaaggtc atttttgaaa ttgctatctg aaacttat 648

<210> 6

<211> 216

5 <212> PRT

<213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<400> 6

Ser Asp Pro Ala Pro Leu Gln Asp Phe Cys Ile Ala Val Asn Asp Pro

1 5 10 15

Asn Ser Ala Val Leu Val Asn Gly Lys Leu Cys Lys Asn Pro Lys Glu

20 25 30

Val Thr Ile Asp Asp Phe Leu Tyr Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Asp

35 40 45

Thr Asn Asn Thr Gln Gly Ala Ser Ala Thr Leu Val Asp Ile Thr Leu

50 55 60

Phe Pro Ala Val Asn Thr Gln Gly Val Ser Met Ala Arg Val Asp Phe

65 70 75 80

Ala Pro Tyr Gly Leu Asn Thr Pro His Leu His Pro Arg Gly Ser Glu

85 90 95

Val Phe Ala Val Met Glu Gly Ile Met Tyr Ala Gly Phe Val Thr Thr

100 105 110
 Asp Tyr Lys Leu Tyr Asp Thr Ile Ile Lys Lys Gly Asp Ile Ile Val
 115 120 125
 Phe Pro Gln Gly Leu Ile His Phe Gln Leu Asn Leu Gly Lys Thr Asp
 130 135 140
 Ala Leu Ala Ile Ala Ser Phe Gly Ser Gln Asn Pro Gly Arg Ile Asn
 145 150 155 160
 Ile Ala Asp Ser Val Phe Gly Thr Thr Pro Arg Val Leu Asp Asp Val
 165 170 175
 Leu Thr Lys Gly Phe Gln Ile Asp Glu Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg
 180 185 190
 Ser Gln Phe Ser Thr Asp Asn Ile Ser Thr Ser Thr Gly Arg Ser Phe
 195 200 205
 Leu Lys Leu Leu Ser Glu Thr Tyr
 210 215

<210> 7
 <211> 639
 5 <212> ADN
 <213> *Musa acuminata*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..639
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Musa acuminata*"

<400> 7
 ttgatccga gtcctctcca agacttttgc gttgctgact acgactccaa cgtgtttgtg 60

 aacggattcg cctgcaagaa agctaaggat gtcacggcag atgacttcta ctcaccggc 120

 ttagacaagc ccgcgagcac cgccaacgag ctggcgcaa acatcactct cgtcaacgtg 180

 gaacgactcc caggcctcaa ctcccttggc gtcgccatgt ctgcacga ctacgcgccc 240

ES 2 694 667 T3

ttcgggtcaca accctcctca ctgcgatcca cgatcgtcgg agatactgca cgtggcggaa 300
 ggaacgctct acgccggctt cgtcacctcc aacacggaaa acggcaacct tctcttcgct 360
 aagaagctga agaagggcga cgcgtttg tg tccccaggg gctcataca ctccagttc 420
 aacatcgggg acaccgatgc ggtggcgttc gctaccttcg gcagccagag cccgggtctc 480
 gtcaccaccg ccaacgcact gttcggatcg aagccgccca tcgctgatta cattcttgcc 540
 caggccgtgc agcttagcaa gacgaccgtg ggctggcttc agcagcagca gtggttgac 600
 atcgtcaag aatatggaca acgcttagtt caagctaata 639

<210> 8
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Musa acuminata*

5

<400> 8
 Phe Asp Pro Ser Pro Leu Gln Asp Phe Cys Val Ala Asp Tyr Asp Ser
 1 5 10 15
 Asn Val Phe Val Asn Gly Phe Ala Cys Lys Lys Ala Lys Asp Val Thr
 20 25 30
 Ala Asp Asp Phe Tyr Phe Thr Gly Leu Asp Lys Pro Ala Ser Thr Ala
 35 40 45
 Asn Glu Leu Gly Ala Asn Ile Thr Leu Val Asn Val Glu Arg Leu Pro
 50 55 60
 Gly Leu Asn Ser Leu Gly Val Ala Met Ser Arg Ile Asp Tyr Ala Pro
 65 70 75 80
 Phe Gly Leu Asn Pro Pro His Ser His Pro Arg Ser Ser Glu Ile Leu
 85 90 95
 His Val Ala Glu Gly Thr Leu Tyr Ala Gly Phe Val Thr Ser Asn Thr
 100 105 110

Glu Asn Gly Asn Leu Leu Phe Ala Lys Lys Leu Lys Lys Gly Asp Ala
 115 120 125
 Phe Val Phe Pro Arg Gly Leu Ile His Phe Gln Phe Asn Ile Gly Asp
 130 135 140
 Thr Asp Ala Val Ala Phe Ala Thr Phe Gly Ser Gln Ser Pro Gly Leu
 145 150 155 160
 Val Thr Thr Ala Asn Ala Leu Phe Gly Ser Lys Pro Pro Ile Ala Asp
 165 170 175
 Tyr Ile Leu Ala Gln Ala Val Gln Leu Ser Lys Thr Thr Val Gly Trp
 180 185 190
 Leu Gln Gln Gln Gln Trp Leu Asp Ile Ala Gln Glu Tyr Gly Gln Arg
 195 200 205
 Leu Val Gln Ala Asn
 210

<210> 9
 <211> 639
 5 <212> ADN
 <213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..639
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Beta vulgaris subsp. vulgaris*"

<400> 9
 atggctcccc tactctacct ttagtagtattc ttgcttgctc cttttctctc ccatgctgcg 60
 gatcccgatc ctttgctaga tttttgtgta gcgacaccta atgcctctcc ctatttgct 120
 aatttccctt gcaaacaac ctcaaattg acctctgaag atttcttctt tgatgggtt 180
 atgaatgagg gaaacacatc aaactcgttt ggatcaaggg tcacaccggg aaacgtcctc 240
 acatttctg ccctaatat gctcgggatt tcaatgaatc gggttgatct tgctgtggat 300

ES 2 694 667 T3

gggatgaacc cgccccattc ccaccacgca gcaagtgaga gcggtgtggt gatgaagggg 360

agagttctag tagggttcgt aaccacgggg aatgtgtact attcaaaggt gttggtcca 420

ggacagatgt ttgtaatccc aaggggggtg gttcatttc aaaagaatgt tggacaaaat 480

aaggcactca tcattacagc ttcaatagt cagaatccag gagtagtggt attatcctca 540

accctgttg gtacaaacct tcaattcca gatgatgttt taagccaaac ttctctagtg 600

gaccagagca ttgtcgaagg aataaaatcc aacttttga 639

<210> 10

<211> 212

<212> PRT

<213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

5

<400> 10

Met Ala Pro Leu Leu Tyr Leu Val Val Phe Leu Leu Ala Pro Phe Leu

1 5 10 15

Ser His Ala Ala Asp Pro Asp Pro Leu Leu Asp Phe Cys Val Ala Asp

20 25 30

Leu Asn Ala Ser Pro Ser Phe Ala Asn Phe Pro Cys Lys Gln Thr Ser

35 40 45

Asn Val Thr Ser Glu Asp Phe Phe Phe Asp Gly Phe Met Asn Glu Gly

50 55 60

Asn Thr Ser Asn Ser Phe Gly Ser Arg Val Thr Pro Gly Asn Val Leu

65 70 75 80

Thr Phe Pro Ala Leu Asn Met Leu Gly Ile Ser Met Asn Arg Val Asp

85 90 95

Leu Ala Val Asp Gly Met Asn Pro Pro His Ser His Pro Arg Ala Ser

100 105 110

Glu Ser Gly Val Val Met Lys Gly Arg Val Leu Val Gly Phe Val Thr

ES 2 694 667 T3

115 120 125
 Thr Gly Asn Val Tyr Tyr Ser Lys Val Leu Val Pro Gly Gln Met Phe
 130 135 140
 Val Ile Pro Arg Gly Leu Val His Phe Gln Lys Asn Val Gly Gln Asn
 145 150 155 160
 Lys Ala Leu Ile Ile Thr Ala Phe Asn Ser Gln Asn Pro Gly Val Val
 165 170 175
 Leu Leu Ser Ser Thr Leu Phe Gly Thr Asn Pro Ser Ile Pro Asp Asp
 180 185 190
 Val Leu Ser Gln Thr Phe Leu Val Asp Gln Ser Ile Val Glu Gly Ile
 195 200 205
 Lys Ser Asn Phe
 210

<210> 11
 <211> 660
 5 <212> ADN
 <213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..660
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Beta vulgaris subsp. vulgaris*"

<400> 11
atggaagtcg tcgcagctgt atcttttctg gccgtggtat tggctctggt ttcccctgcc 60

ctcgccaatg atcctgatat gctccaagat gtttgtgtcg ctgattccac ctctggagtg 120

aaattgaatg gatttgcatt caaggatgca gcaagcatta caccagaaga ctcttcttt 180

gctggaatat ccaaaccgg aatgacaaac aatacaatga aatccctagt aaccggagct 240

aacgtcgaaa agataccggg tftaaacaca ctggagtggt ccatgggtcg tatcgacttc 300

ggcccagggtg gtcttaaccc acctcacact caccacagag ccacagaaat ggtctttgtg 360

ttatatggag aattggacgt tggtttcta actacttcta ataagctcat ttctaagcat 420

attaaaactg gtgaaacttt tgttttct agagggttag tccacttca gaaaaataat 480

ggggataaac ctgctgcttt agtcactgct ttaatagtc agttgcctgg cacccaatca 540

atagctgcca cgtgttttac gtcgaccca cctgttccag ataatgtttt aactatgact 600

ttccaagtgc gtactaaaca agtccagaag atcaaggcta ggctcgtccc taagaagtaa 660

<210> 12

<211> 219

5 <212> PRT

<213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<400> 12

Met Glu Val Val Ala Ala Val Ser Phe Leu Ala Val Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Ser Pro Ala Leu Ala Asn Asp Pro Asp Met Leu Gln Asp Val Cys

20 25 30

Val Ala Asp Ser Thr Ser Gly Val Lys Leu Asn Gly Phe Ala Cys Lys

35 40 45

Asp Ala Ala Ser Ile Thr Pro Glu Asp Phe Phe Phe Ala Gly Ile Ser

50 55 60

Lys Pro Gly Met Thr Asn Asn Thr Met Lys Ser Leu Val Thr Gly Ala

65 70 75 80

Asn Val Glu Lys Ile Pro Gly Leu Asn Thr Leu Gly Val Ser Met Gly

85 90 95

Arg Ile Asp Phe Gly Pro Gly Gly Leu Asn Pro Pro His Thr His Pro

100 105 110

Arg Ala Thr Glu Met Val Phe Val Leu Tyr Gly Glu Leu Asp Val Gly

115 120 125

Phe Leu Thr Thr Ser Asn Lys Leu Ile Ser Lys His Ile Lys Thr Gly
 130 135 140
 Glu Thr Phe Val Phe Pro Arg Gly Leu Val His Phe Gln Lys Asn Asn
 145 150 155 160
 Gly Asp Lys Pro Ala Ala Leu Val Thr Ala Phe Asn Ser Gln Leu Pro
 165 170 175
 Gly Thr Gln Ser Ile Ala Ala Thr Leu Phe Thr Ser Thr Pro Pro Val
 180 185 190
 Pro Asp Asn Val Leu Thr Met Thr Phe Gln Val Gly Thr Lys Gln Val
 195 200 205
 Gln Lys Ile Lys Ala Arg Leu Ala Pro Lys Lys
 210 215

<210> 13
 <211> 669
 5 <212> ADN
 <213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..669
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Beta vulgaris subsp. vulgaris*"

<400> 13
 atggcggctg ttgggtagt ctgggtggg ctagcggcgg ctttgctgt tggggcttt 60

 gccagcgc atgatgct tcaagatgt tgtgtgctg atcgtacatc tggaatatta 120

 gtgaatggat tcacatgtaa aaatagacc atgataacc ctgaagactt ctcttcacc 180

 ggaattcac aaccaggcca aatcacaat aaaatcctg gttctcgagt caccggagcg 240

 aatgtgcagg acatccctgg tctcaacacc ttgggagtct cgatggctcg tctcgacttt 300

 actccctacg gtctaaacc acctcacatt caccctagaa tctgccacc tctgcccact 360

gaaatgatct atgttcttaa gggatgaattg tacgttggtt ttataacgac cgacaataag 420

ctcatttcca aggttgtaa agctggagaa gtattgttt tcctagagg ttggctcac 480

ttcagaaaa acatgtgaa atatccagct gctgcattag ctgccttcaa cagccaactt 540

ccaggcactc aacaattgc agctgctctc ttacttcca atcctcctgt gtctaataat 600

gtgttggtc aggcctttaa cattgacgaa cacaatgtca aaaagattag ggctggcctt 660

actccatag 669

<210> 14

<211> 217

<212> PRT

<213> *Beta vulgaris subsp. vulgaris*

5

<400> 14

Met Ala Ala Val Trp Val Val Leu Val Val Leu Ala Ala Ala Phe Ala

1 5 10 15

Val Gly Val Phe Ala Ser Asp Pro Asp Met Leu Gln Asp Val Cys Val

20 25 30

Ala Asp Arg Thr Ser Gly Ile Leu Val Asn Gly Phe Thr Cys Lys Asn

35 40 45

Met Thr Met Ile Thr Pro Glu Asp Phe Phe Phe Thr Gly Ile Ser Gln

50 55 60

Pro Gly Gln Ile Thr Asn Lys Ile Leu Gly Ser Arg Val Thr Gly Ala

65 70 75 80

Asn Val Gln Asp Ile Pro Gly Leu Asn Thr Leu Gly Val Ser Met Ala

85 90 95

Arg Val Asp Phe Thr Pro Tyr Gly Leu Asn Pro Pro His Ile His Pro

100 105 110

Arg Ala Thr Glu Met Ile Tyr Val Leu Lys Gly Glu Leu Tyr Val Gly

115 120 125
 Phe Ile Thr Thr Asp Asn Lys Leu Ile Ser Lys Val Val Lys Ala Gly
 130 135 140
 Glu Val Phe Val Phe Pro Arg Gly Leu Ala His Phe Gln Lys Asn Met
 145 150 155 160
 Leu Lys Tyr Pro Ala Ala Ala Leu Ala Ala Phe Asn Ser Gln Leu Pro
 165 170 175
 Gly Thr Gln Gln Phe Ala Ala Ala Leu Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val
 180 185 190
 Ser Asn Asp Val Leu Ala Gln Ala Phe Asn Ile Asp Glu His Asn Val
 195 200 205
 Lys Lys Ile Arg Ala Gly Leu Thr Pro
 210 215

<210> 15
 <211> 660
 5 <212> ADN
 <213> *Musa acuminata*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..660
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/organismo="*Musa acuminata*"

<400> 15
 atggagtcgc actacacgaa gagaccattc ctctctttc tctcctcac cgtcctcctc 60

 gtgtgatcc gcgctgacct tgatctctc caggacttct gcgtcgccga cctcggagct 120

 actgtggctg tcaatgggtt cccgtgcaag cccgcgtccg gagtcacgtc cgacgacttc 180

 ttctcgccg gactgtccag ggagggcaac accagcaata tcttcgggtc caacgtgacc 240

 aacgccaaca tgctcagctt cccggggctc aacaccctcg gcgtctccat gaaccgctc 300

ES 2 694 667 T3

gacgtcgccc ccggcggcac caaccgccc cacagccacc cgagggtac cgagctcatc 360

atcctctca agggccggct gctggtggg tcatcagca ccagtaacca gttctctcc 420

aaggcttga acccggcga gatgtctgt gtgccaagg ggctcatcca cttccagtac 480

aacgtcggca aggagaaggc gctcgccatc accacctcg acagccagct cccggagta 540

gtgatcgct ccaccacct gttcgcatcg aatccggcga ttccgacga tgtgctggcc 600

aaagctttc aggtggacgc gaaggtctc gctctcatca agtccaagtt tgagagataa 660

<210> 16

<211> 219

<212> PRT

<213> *Musa acuminata*

5

<400> 16

Met Glu Ser His Tyr Thr Lys Arg Pro Phe Leu Leu Phe Leu Ser Phe

1 5 10 15

Thr Val Leu Leu Val Leu Ile Arg Ala Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp

20 25 30

Phe Cys Val Ala Asp Leu Gly Ala Thr Val Val Val Asn Gly Phe Pro

35 40 45

Cys Lys Pro Ala Ser Gly Val Thr Ser Asp Asp Phe Phe Phe Ala Gly

50 55 60

Leu Ser Arg Glu Gly Asn Thr Ser Asn Ile Phe Gly Ser Asn Val Thr

65 70 75 80

Asn Ala Asn Met Leu Ser Phe Pro Gly Leu Asn Thr Leu Gly Val Ser

85 90 95

Met Asn Arg Val Asp Val Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ser

100 105 110

His Pro Arg Ala Thr Glu Leu Ile Ile Leu Leu Lys Gly Arg Leu Leu

115 120 125

Val Gly Phe Ile Ser Thr Ser Asn Gln Phe Phe Ser Lys Val Leu Asn
 130 135 140
 Pro Gly Glu Met Phe Val Val Pro Lys Gly Leu Ile His Phe Gln Tyr
 145 150 155 160
 Asn Val Gly Lys Glu Lys Ala Leu Ala Ile Thr Thr Phe Asp Ser Gln
 165 170 175
 Leu Pro Gly Val Val Ile Ala Ser Thr Thr Leu Phe Ala Ser Asn Pro
 180 185 190
 Ala Ile Pro Asp Asp Val Leu Ala Lys Ala Phe Gln Val Asp Ala Lys
 195 200 205
 Val Val Ala Leu Ile Lys Ser Lys Phe Glu Arg
 210 215

5 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 510F"/organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 17
 ccgctcgaga aaagatctga tctgtgtctc ctacag 36

20 <210> 18
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..37
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador510R"/organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 18
 aaatatgcfg ccgctcaagc aacatcagtt aagagtt 37

35 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 560F"/organismo="Secuencia artificial"

ES 2 694 667 T3

<400> 19
 ccgctcgaga aaagatccga tctgcaccc ctt 33

5 <210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 5601R"/organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 20
 aaatatgCGG ccgctcaata agttcagat agcaattc 39

20 <210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 30640F"/organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 21
 ccgctcgaga aaagattga tccgagtct ctcca 35

35 <210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..38
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="cebador 30640R"/organismo="Secuencia artificial"

45 <400> 22
 aaatatgCGG ccgctcaatt agctgaact aagcgttg 38

50 <210> 23
 <211> 5900
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..5900
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="secuencia de plásmido pET-32a(+)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 23

ES 2 694 667 T3

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60

cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcgcc agcgcgccgct ccttcgctt tcttccttc 120

cttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180

gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa ctgattagg gtgatggttc 240

acglagtggg ccatcgccct gatagacggg tttcgcctt ttgacgttg agtccacgtt 300

cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctattc 360

tttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420

acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaattcag gtggcacttt 480

tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg ttatttttc taaatacatt caaatatgta 540

tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600

gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tcccttttt gcggcatttt gccttctgt 660

ES 2 694 667 T3

tttgcacac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720

agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc ctgagagatt ttcgccccga 780

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg 840

tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttgg 900

tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960

cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

aggaccgaag gagctaaccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1080

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200

ccggcaaaa ttaatagact ggatggagc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320

cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440

actgattaag cattggtaac tgcagacca agtttactca tataacttt agattgattt 1500

aaaactcat ttttaatta aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata atctcatgac 1560

caaaatccct taacgtgagt tttcgtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620

aggatcttct tgagatcctt ttttctgcy cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

accgtacca gcggtggttt gtttgcgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt 1740

ES 2 694 667 T3

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagttagc cgtagttagg 1800

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tctgttacc 1860

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttgactcaa gacgatagtt 1920

accggataag gcgagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga 1980

gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040

tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100

cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160

cctctgactt gagcgtgat tttgtgatg ctctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220

cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccctttgc tggcctttg ctacatggt 2280

ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga 2340

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagagca gtgagcggag aagcgggaaga 2400

gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtcgggt attcacacc gcatatatgg 2460

tgcacttca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520

cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct 2580

gacgggcttg tctgctccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640

gcatgttca gaggtttca ccgcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700

catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgctg tcatccgcg tccagctcgt 2760

tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggcatg ttaaggcgg 2820

ES 2 694 667 T3

tttttctg ttggctact gatgcctccg tgaaggggg atttctgtc atgggggtaa 2880

tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940

ggttactgga acgttgtag ggtaaacaac tggcggatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000

aaatcactca gggcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacaggga 3060

gccagcagca tctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgag 3120

ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgtgtgtct caggtcgcag 3180

acgttttga gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240

cagtaaggca accccgccag cctagccggg tctcaacga caggagcacg atcatgcga 3300

cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg 3360

gaccagtgc gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420

cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggg cctcgcgaa aatgaccag agcgctgccg 3480

gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca 3540

tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggctgag 3600

atcccgggtc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 3660

tccagtggg aaacctgtcg tgccagctgc ataatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720

gcggtttgcg tattggggcgc caggtgggtt ttcttttca ccagtgagac gggcaacagc 3780

tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcgggtccac gctggtttgc 3840

cccagcaggc gaaaatcctg ttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgict 3900

ES 2 694 667 T3

tcggtatcgt cgtatccac tacgagatg tccgcaccaa cgcgagccc ggactcggta 3960

atggcgcgca ttgcgccag cgccatctga tcgtggcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020

atgccctcat tcagcattg catggttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080

tcccgtccg ctatcggctg aattgattg cgagtgatg atttatgcca gccagccaga 4140

cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgattg ctgggaccc 4200

aatgcgacca gatgctccac gccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260

ttgatgggtg tctggcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320

tccacagcaa tggcatcctg gtcatccagc ggatagtaa tgatcagccc actgacgcgt 4380

tgcgcgagaa gattgtcac cgccgctta caggcttga cgccgcttcg ttctaccatc 4440

gacaccacca cgctggcacc cagttgatcgc gcgagatg taatcgccgc gacaattgc 4500

gacggcgcgt gcagggccag actggagggtg gcaacgcca tcagcaacga ctgttgccc 4560

gccagtgtt gtgccacgcg gttgggaatg taaticagct ccgcatcgc cgcttccact 4620

tttcccgcg tttcgcaga aacgtggctg gcctggtca ccacgcggga aacggtctga 4680

taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgta ctggtttcac attcaccacc 4740

ctgaattgac tctctccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggttt gcgccattcg 4800

atggtgtccg ggatctcgc gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860

tagtaggttg aggccgtga gcaccgccg cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920

gccaacagt cccccgccca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgtcat 4980

ES 2 694 667 T3

gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc 5040

aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100

cgatctcgat cccgcgaaat taatcgcact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160

ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatacatat gagcgataaa 5220

attattcacc tgactgacga cagtttgac acggatgtac tcaaagcgga cggggcgatc 5280

ctcgtcgatt tctgggcaga gtggtgcggt ccgtgcaaaa tgatcgcccc gattctggat 5340

gaaatcgctg acgaatatca gggcaaactg accgttgcaa aactgaacat cgatcaaaaac 5400

cctggcactg cgccgaaata tggcatccgt ggtatcccga ctctgctgct gttcaaaaac 5460

ggtgaagtgg cggcaaccaa agtgggtgca ctgtctaaag gtcagttgaa agagttctc 5520

gacgctaacc tggccggttc tggttctggc catatgcacc atcatcatca tcatttctt 5580

ggtctggtgc cacgcggttc tggtatgaaa gaaaccgctg ctgctaaatt cgaacgccag 5640

cacatggaca gccagatct gggtagccgac gacgacgaca aggccatggc tgatatcgga 5700

tccgaattcg agctccgtcg acaagcttgc ggccgcactc gagcaccacc accaccacca 5760

ctgagatccg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga 5820

gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgagggggtt ttttgctgaa 5880

aggaggaact atatccggat 5900

ES 2 694 667 T3

<210> 24
 <211> 5423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..5423
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado"/nota="plásmido pAT"/organismo="Secuencia artificial"

10

<400> 24
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcggtgtgg tggttacgcg 60

 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgccgct ctttcgctt tcttccttc 120

 ctttctgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180

 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240

 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300

 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360

 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420

 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480

 tcggggaaat gtgcgcgga a cccctatttg tttattttc taaatacatt caaatatgia 540

 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600

 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tcctttttt gcggcatttt gccttctgt 660

 ttttgctcac ccagaaacgc tgggaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720

 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780

ES 2 694 667 T3

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg 840

tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttgg 900

tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960

cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020

aggaccgaag gagctaaccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1080

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140

tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 1200

ccggcaacaa ttaatagact ggatggagc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320

cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440

actgattaag cattgtaac tgcagacca agttactca tatatacttt agattgatt 1500

aaaactcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata atctcatgac 1560

caaaatccct taacgtgagt ttctgtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620

aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

accgtacca gcggtggttt gttgcccga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740

aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagttagc cgtagttagg 1800

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacataccct gctctgctaa tctgttacc 1860

ES 2 694 667 T3

agtggctgct gccagtggcg alaagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920

accggataag ggcagcgggt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga 1980

gccaacgacc tacaccgaac tgagalacct acagcgtgag clatgagaaa gcgccacgct 2040

tccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100

cacgagggag ctccagggg gaaacgcctg gtaclttat agtcctgtcg ggttcgcca 2160

cctctgactt gagcgtgat tttgtgatg ctgctcagg gggcggagcc tatggaaaa 2220

cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttc tggcctttg ctacatggt 2280

ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga 2340

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagagca gtgagcggagg aagcgggaaga 2400

gcgcctgatg cggatatttc tcctacgca tctgtcgggt attcacacc gcatatatgg 2460

tgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520

cgctacgiga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgcctt 2580

gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640

gcatgtgtca gaggtttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700

catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgcg tccagctcgt 2760

tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggcatg ttaagggcgg 2820

tttttctg tttggctact gatgccctcg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880

tgataccgat gaaacgagag aggatgtcga cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940

ES 2 694 667 T3

ggttactgga acgttgtag ggtaaacaac tggcggtag gatgcggcgg gaccagagaa 3000

aatcactca gggtaaatgc cagcgcttcg ttaatacaga ttaggtgtt ccacaggga 3060

gccagcagca tctgcatg cagatccgga acataatgt gcagggcgct gactccgag 3120

ttccagact ttacgaaaca cgaaaccga agaccattca tgtgtgct caggctcag 3180

acgtttgca gcagcagtcg ctccacgttc gctcgcgtat cgggtattca ttctgtaac 3240

cagtaaggca acccggcag cctagccggg tctcaacga caggagcacg atcatgcga 3300

cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttcg gccgaaactg ttggtggcg 3360

gaccagtac gaaggctga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc 3420

cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggc cctcggcga aatgaccag agcgctccg 3480

gcacctgcc tacgagttgc atgataaaga agacagtc atagtggcg acgatagca 3540

tgccccgcg ccaccggaag gagctgactg ggtgaaggc tctcaaggc atcgctcag 3600

atcccggtgc ctaatgagtg agctaacta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 3660

tccagtggg aaacctgctg tgccagctgc ataatgaat cggccaacgc gcggggagag 3720

gcggttgcg tattggcgc cagggtggtt ttctttca ccagtgagac gggcaacagc 3780

tgattgccct tcaccgctg gccctgagag agttgcagca agcgggtccac gctggttgc 3840

cccagcaggc gaaaatcctg ttgatggtg gtaacggcg ggatataaca tgagctgtct 3900

tcggtatcgt cgtatccac tacgagatg tccgaccaa cgcgcagccc ggactcggta 3960

atggcgcgca ttgcgccag cgccatcga tcgtggcaa ccagcatcgc agtgggaacg 4020

ES 2 694 667 T3

atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct 4080

tcccgttccg ctatcggctg aattgattg cgagtgagat atttatgccca gccagccaga 4140

cgcagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgattg ctggtgaccc 4200

aatgcgacca gatgctccac gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg 4260

ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct 4320

tccacagcaa tggcatcctg gtcattccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt 4380

tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttoga cgccgcttcg ttctaccatc 4440

gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc 4500

gacggcgcgt gcagggccag actggagggtg gcaacgccaa tcagcaacga ctgtttgcc 4560

gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgcatcgc cgcttccact 4620

tttcccgcg ttttcgaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga 4680

taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc 4740

ctgaattgac tctctccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg 4800

atggigtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag 4860

tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc 4920

gccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgtcat 4980

gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggigtatg tcggcgatat aggcgccagc 5040

aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat 5100

ES 2 694 667 T3

cgatctgat cccgcgaaat taatcgcact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 5160

ttccctcta gaaataattt tgttaactt taagaaggag atatacccat ggctgatac 5220

ggatccgaat tcgagctccg tcgacaagct tgcggccgca ctcgagcacc accaccacca 5280

ccactgagat ccggctgcta acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc 5340

tgagcaataa ctagcataac ccctggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttgct 5400

gaaaggagga actatatccg gat 5423