



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 741**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/40** (2006.01)  
**C12N 11/08** (2006.01)  
**C12N 15/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06005241 .2**  
96 Fecha de presentación : **15.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1835035**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **Un proceso para la inmovilización de células en una resina.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.08.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.08.2010**

73 Titular/es: **EXPLORA Laboratories S.A.**  
**Via Rime, 38**  
**6850 Mendrisio, CH**

72 Inventor/es: **Zuffi, Gabriele y**  
**Monciardini, Simone**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 343 741 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Un proceso para la inmovilización de células en una resina.

**5 Campo de aplicación**

La presente invención en general se refiere a un proceso para la inmovilización de células y al uso de una resina para la inmovilización de células.

**10 Técnica anterior**

Desde hace varias décadas<sup>1</sup> la inmovilización de células es un técnica bien conocida, usada con el fin de mejorar procesos de fermentación y biosíntesis. Las técnicas más normalmente usadas para inmovilizar células son aquellas que implican el establecimiento de enlaces covalentes entre las células y un soporte inorgánico activado, como por ejemplo sílice silanizado<sup>2</sup> o tratado con glutaraldehído e isocianato<sup>3</sup>, o un entrecruzamiento entre las células mediante reactivos bi- o polifuncionales, tales como por ejemplo, glutaraldehído<sup>4</sup> y diisocianato de tolueno o la captura en matrices poliméricas, como por ejemplo, agar, alginatos, carragenanos, celulosa y sus derivados, colágeno, gelatina y poliacrilamida.

Una técnica que se usa menos que las anteriores está representada por la adsorción en soportes tales como tierra de diatomeas, vidrio, cerámica y materiales plásticos, producida por interacciones electrostáticas (fuerzas de Van der Waals) entre el soporte y las células.

En 1960-61 se describió un ejemplo<sup>5,6</sup> de adsorción de células en una resina de intercambio iónico, y precisamente la adsorción de células de *Escherichia coli* en una resina de intercambio aniónico fuerte (Dowex 1), pero después de eso en la bibliografía solo se citan ejemplos de inmovilización de células realizadas mediante captura, en general sobre carragenano, alginatos y poliacrilamidas.

Esto es probablemente debido a la escasa estabilidad de las inmovilizaciones obtenidas hasta ahora mediante las técnicas de adsorción y particularmente de las inmovilizaciones en resinas.

Sería deseable en su lugar hacer disponible un proceso para inmovilizar células de forma permanente en resinas mediante adsorción, porque de tal manera las células no se someten a choque mecánico ni a degradación química, se mantienen a sí mismas vitales y mantienen a un nivel máximo su propia capacidad de mantener las enzimas que producen en condiciones fisiológicas óptimas y para catalizar consecuentemente reacciones que son útiles para diferentes vías biosintéticas o de fermentación.

**Compendio de la invención**

El problema subyacente a la presente invención era el de proporcionar un proceso para inmovilizar células de forma permanente mediante adsorción a resinas, de tal manera que se puedan usar particularmente para realizar reacciones catalizadas por las enzimas producidas por las células mismas.

Tal problema se resolvió, según la invención, mediante un proceso para inmovilizar células, que incluye una fase de adsorción de tales células en una resina en donde dichas células son células de *Escherichia coli* y dicha resina es la resina de intercambio aniónico débil, resina Duolite A568<sup>®</sup> (Rohm & Haas).

En el proceso de inmovilización de células según la presente invención, se usa preferiblemente una relación entre el peso húmedo de las células (pasta celular) y el peso seco de la resina comprendida entre 0,5:1 y 2:1, ventajosamente alrededor de 1:1. La pasta celular tiene un contenido de agua comprendido entre el 70 y el 80% peso/peso.

La inmovilización se realiza operando en un medio tamponado acuoso a pH 7,4, preferiblemente usando un tampón fosfato con una molaridad que varía entre 0,1 M y 1 M, ventajosamente igual a alrededor de 0,5 M.

El tiempo de contacto entre la resina y las células necesario para obtener la inmovilización de las últimas es mayor de o igual a 24 horas y preferiblemente mayor de o igual a 72 horas.

Mediante el proceso según la presente invención también es posible inmovilizar al mismo tiempo en la resina al menos dos tipos de células diferentes, que son capaces de producir diferentes enzimas.

En particular, es posible coinmovilizar células de *Escherichia coli* que producen uridina fosforilasa (UPasa) y células de *Escherichia coli* que producen purina nucleósido fosforilasa (PNPasa).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de nucleósidos, que comprende la reacción reversible de una pentosa-1-fosfato con una base de purina o pirimidina, en presencia de células que producen UPasa y/o PNPasa, inmovilizadas por medio del proceso descrito anteriormente, en donde dichas células son células de la especie de *Escherichia coli*.

El término “nucleósidos” se refiere tanto a nucleósidos naturales como modificados, así como los términos “base de purina” y “base de pirimidina” se refieren tanto a bases naturales como a bases modificadas.

Según una forma de realización adicional, dichas células se coinmovilizan en la resina.

5

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un proceso para la transglicosilación de nucleósidos, que comprende la reacción entre un nucleósido de pirimidina y una base de purina o entre un nucleósido de purina y una base de pirimidina o entre un nucleósido de pirimidina y una base de pirimidina que es diferente de la presente en dicho nucleósido de pirimidina o por último entre un nucleósido de purina y una base de purina que es diferente de la presente en dicho nucleósido de purina, en donde tal reacción se produce en presencia de células que producen UPasa y de células que producen PNPasa o en presencia de células que producen UPasa y PNPasa, en donde dichas células que producen UPasa y dichas células que producen PNPasa son células de *Escherichia coli* y en donde dichas células se inmovilizan mediante el proceso de inmovilización descrito anteriormente.

El uso de células de *Escherichia coli* de la cepa DH5alfa transformadas por los vectores plásmidos que tienen las secuencias descritas en las Seq. Id. No. 1 y 2 es particularmente preferido.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un proceso de transglicosilación entre 2'-fluoroadenina y arabinofuranosil uracilo para dar fludarabina, en donde tal reacción se produce en presencia de células productoras de UPasa y de células productoras de PNPasa o en presencia de células que producen UPasa y PNPasa, en donde dichas células productoras de UPasa y dichas células productoras de PNPasa son células de *Escherichia coli* y en donde dichas células se inmovilizan mediante el proceso de inmovilización descrito anteriormente.

La utilización de células de *Escherichia coli* de la cepa DH5alfa transformadas por los vectores plásmidos que tienen las secuencias descritas en las Seq. Id. No. 1 y 2 es particularmente preferido. Adecuadamente, las células de *Escherichia coli* transformadas con los vectores plásmidos de la Seq. Id. No. 1 y con los vectores plásmidos de la Seq. Id. No. 2 se coinmovilizan en la resina.

### 30 Descripción detallada de la invención

El proceso para inmovilizar células según la presente invención se alcanzó durante estudios y experimentos cuyo fin era mejorar un sistema de biocatalizadores utilizable para la producción, incluso a escala industrial, de nucleósidos y análogos modificados, particularmente en referencia a fludarabina.

35

Para este fin, se decidió usar reacciones de bioconversión, usando enzimas procariotas, que son preferibles porque tienen una especificidad de sustrato más amplia, son fácilmente obtenibles en grandes cantidades de fuentes celulares y se conocen bien respecto a sus vías metabólicas.

Los sistemas enzimáticos que se pueden usar para la biosíntesis de nucleósidos naturales y/o modificados son principalmente dos: desoxirribosil transferasas (DRTasas) y nucleósido fosforilasas (NP)<sup>7,8</sup>.

Las desoxirribosil transferasas tienen la desventaja de ser muy específicas para 2-desoxirribosa y por esta razón sólo se pueden usar para desoxinucleótidos en posición 2'.

45

Las nucleósido fosforilasas son enzimas, que están presentes en la mayoría de las bacterias, en levaduras y también en eucariotas superiores y se dividen en dos clases basadas en su estructura cuaternaria, su plegamiento y la clase de sustrato sobre el que actúan.

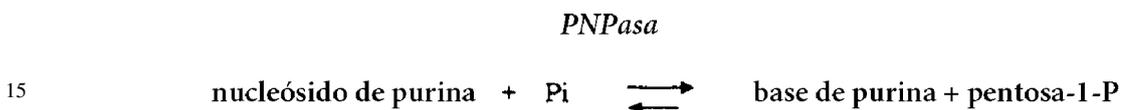
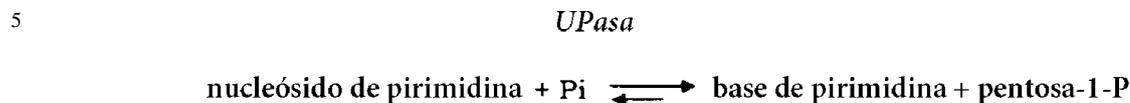
En particular, las enzimas uridina fosforilasa (E.C. 2.4.2.3) y purina nucleósido fosforilasa (E.C. 2.4.2.1) están particularmente indicadas para realizar reacciones de bioconversión para la producción de moléculas de interés industrial, en virtud de su gran estabilidad térmica y la posibilidad que tienen de funcionar también a altas concentraciones de solvente.

De forma diferente a las DRTasas, las fosforilasas procariotas tienen menor especificidad de sustrato respecto al azúcar y son capaces de reconocer por ejemplo ribosa, desoxirribosa, didesoxirribosa, arabinosa y varias modificaciones en las posiciones 2', 3' o 5'. También con respecto a las bases nitrogenadas, las enzimas fosforilasas tienen baja especificidad de sustrato y también son capaces de reconocer, aparte de bases naturales más o menos modificadas, otros compuestos heterocíclicos. Sin embargo, un requerimiento fundamental es la presencia de un átomo de nitrógeno en la posición 1 de pirimidinas y en la posición 9 de purinas, que se une al carbono del azúcar una vez que el fosfato ha desaparecido<sup>9,10</sup>.

Las dos enzimas se conocen bien en la bibliografía, tanto en su secuencia de aminoácidos, que está conservada en diferentes organismos, como desde el punto de vista de la genética molecular. De hecho, se conocen los genes que las codifican (UdP para uridina fosforilasa y deoD para purina nucleósido fosforilasa) y las secuencias asociadas están disponibles en las bases de datos apropiadas.

## ES 2 343 741 T3

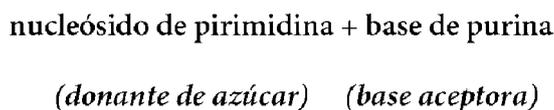
Ambas enzimas pertenecen a las vías salvajes de nucleósidos y catalizan, en presencia de iones fosfato, la fosforólisis reversible del nucleósido para dar azúcar-1-fosfato y la correspondiente base heterocíclica como se describe en el siguiente esquema



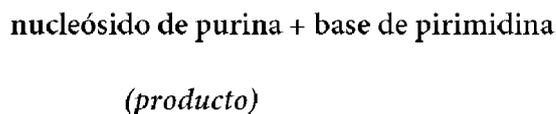
Es posible transferir el azúcar de un nucleósido de una base de pirimidina a otra, usando uridina fosforilasa, y de una base de purina a otra usando la purina nucleósido fosforilasa.

20 Por lo demás, usando ambas fosforilasas, es posible transferir el azúcar de una base de pirimidina a una base de purina o viceversa. Las constantes de equilibrio de las dos reacciones de fosforólisis en general fomentan la transferencia del azúcar de una base de pirimidina a una base de purina con altos rendimientos de conversión.

25 Se describe un esquema de dos reacciones acopladas:



35

$$(\text{UdPasa} + \text{PNPasa})$$


Así se hace disponible un método eficaz para la producción de nucleósidos de purina, que en general son de mayor valor y un planteamiento más difícil desde el punto de vista químico<sup>11,12,13,14</sup>.

50 Esta vía sintética muestra diferentes ventajas comparada con la química, que incluyen la estereoespecificidad y estereoselectividad (con el rendimiento mayor asegurado), el uso de condiciones de reacción más suaves, en un medio acuoso con menor impacto medioambiental. Además, no se requieren reacciones largas y caras para proteger y desproteger grupos lábiles.

55 Por otra parte, las desventajas son la relativamente baja solubilidad de los sustratos y la baja actividad específica de las células procariontas. Para obviar al última desventaja, ya se han construido y descrito en la bibliografía cepas recombinantes capaces de sobreproducir las actividades enzimáticas fosforilasas, también con las dos enzimas sobreexpresadas en la misma célula<sup>15,16</sup>.

Ya se han descrito reacciones de transglicosilación (transferencia del azúcar de una base a otra) por medio de biocatalizadores. En estas reacciones se usaron células enteras o enzimas más o menos purificadas e inmovilizadas<sup>17,18,19</sup>.

60 Cuando se usan células enteras que no están en soporte, no es posible reutilizarlas a menos que se retengan por medio de membranas de micro- o ultracentrifugación, pero tal método requiere plantas dedicadas y volúmenes de operación muy grandes, implica problemas de posible precipitación con productos escasamente solubles y puede producir fácilmente una lisis celular debido a las presiones de operación. Además la inmovilización de enzimas necesita procesos largos y caros que implican rotura celular, recuperación de las enzimas y eliminación de los restos celulares, operaciones que no son fáciles de llevar a cabo a gran escala y que requieren plantas caras y dedicadas.

65

## ES 2 343 741 T3

El método para inmovilizar células bacterianas descrito en la presente invención permite obtener un biocatalizador con alta actividad específica, que se puede reutilizar para numerosos ciclos y es capaz de funcionar a altas temperaturas también en presencia de alta concentración de solvente orgánico.

5 La extrema simplicidad del método descrito en la presente invención hace el proceso para obtener un biocatalizador con tales características mucho más rentable, ya que no necesita plantas dedicadas sino sólo herramientas de uso general, y reduce notablemente los tiempos de preparación y el número de pasos necesarios.

10 La posibilidad de realizar reacciones de biosíntesis de nucleósidos por medio de células productoras de fosforilasa, inmovilizadas en una resina, se verificó inicialmente en cepas salvajes de *Escherichia coli*.

Primero de todo, se verificó la capacidad de tales cepas de catalizar la biosíntesis de nucleósidos como sigue.

### *Reacción de fludarabina con Escherichia coli de tipo salvaje*

15 A 2940 ml de solución de 2'-fluoroadenina 5 mM; ara-U (arabinofuranosil-uracilo) 7,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM a pH 7,0 en DMSO al 4% y exactamente controlado a 60°C, se añaden 60 ml de una suspensión celular al 47,5% (peso húmedo/volumen) de *Escherichia coli* de tipo salvaje.

20 Después de 6 días de incubación, la mezcla de reacción se filtra, eliminando así las células. La base fludarabina se precipita del agua después de la concentración del material filtrado. El rendimiento de bioconversión es alrededor del 68%.

Las células de *Escherichia coli* se inmovilizaron después como sigue.

### 25 1. Inmovilización de *Escherichia coli* de tipo salvaje

Inicialmente se propuso evaluar la posibilidad de inmovilizar células de *Escherichia coli* mediante una resina.

30 Para hacer esto, se dividió una suspensión de pasta celular de *Escherichia coli* al 10% (peso húmedo/volumen) en tampón fosfato de potasio 1 M a pH 7,5 en tres alícuotas. La primera alícuota (10 ml) se usa como control mientras que las otras dos alícuotas (10 ml cada una) se someten respectivamente a 3 y 6 ciclos subsecuentes alternados entre congelación a -20°C y descongelación a 50°C para producir la rotura de la pared celular. Se añade 1 gramo de resina seca Duolite A568 (Rohm & Haas) a cada alícuota de suspensión celular, y se deja en contacto con agitación rotacional suave 4 días a temperatura ambiente.

35 Después de la incubación anterior, la resina se filtra y se lava completamente con agua desionizada hasta que se obtiene un filtrado perfectamente transparente.

40 De cada prueba se obtienen alrededor de 2,5 g de resina húmeda. La actividad de la resina inmovilizada se controla mediante una reacción estándar que requiere el acoplamiento de las dos actividades fosforilasas. La reacción, que empieza de Ara-U y adenina, en presencia de iones fosfato, produce la formación del nuevo nucleósido Ara-A (arabinosa-adenina), obtenido mediante adición de adenina al azúcar arabinosa y de la base uracilo liberada por la fosforólisis de Ara-U.

45 Se añade 1 ml de la siguiente mezcla de reacción ajustada a 60°C a alícuotas de 100 ó 200 mg de resina húmeda: Ara-U 5 mM; adenina 5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM a pH 7,1.

Se realiza la incubación con agitación y las tres reacciones se controlan después del mismo tiempo de incubación

Muestra (2 h)	Conversión Adenina → Ara-A	Conversión Ara-U → Uracilo
100 mg Control	11,4%	16,2%
200 mg Control	24,0%	37,6%
100 mg 3 ciclos de congelación/descongelación	6,8%	7,2%
200 mg 3 ciclos de congelación/descongelación	10,2%	10,6%
100 mg 6 ciclos de congelación/descongelación	4,0%	5,2%
200 mg 6 ciclos de congelación/descongelación	6,9%	8,7%

## ES 2 343 741 T3

Las reacciones se controlaron después de 1 día

Muestra (24 h)	Conversión Adenina →Ara-A	Conversión Ara-U →Uracilo
200 mg Control	68,20%	81,5%
200 mg 3 ciclos de congelación/descongelación	64,2%	51,0%
200 mg 6 ciclos de congelación/descongelación	58,0%	42,0%

La suspensión de células sin tratar inesperadamente mostró una actividad definitivamente mayor comparada con aquellas sometidas a ciclos de congelación descongelación.

Las mismas muestras de resina se sometieron a reacciones posteriores para ver si tenían éxito en mantener las actividades enzimáticas también en ciclos posteriores.

Muestra 2 <sup>a</sup> reacción (2 h)	Conversión Adenina →Ara-A	Conversión Ara-U →Uracilo
200 mg Control	18,2%	14,2%
200 mg 3 ciclos de congelación/descongelación	12,8%	8,1%
200 mg 6 ciclos de congelación/descongelación	9,8%	6,3%

Muestra 3 <sup>a</sup> reacción (2 h)	Conversión Adenina →Ara-A	Conversión Ara-U →Uracilo
200 mg Control	27,0%	19,4%
200 mg 3 ciclos de congelación/descongelación	14,4%	10,1%
200 mg 6 ciclos de congelación/descongelación	11,5%	8,0%

Las actividades se mantuvieron en todas las pruebas y todas las reacciones; en las mismas condiciones de trabajo, el control tenía al menos alrededor del doble de actividad.

Después de esto, se verificó la compatibilidad de tales células inmovilizadas con altas concentraciones de solventes orgánicos en las mezclas de reacción.

### 2. Reacciones a fludarabina con resina inmovilizada en diferentes solventes

Se usó la resina que tenía las células de *Escherichia coli* de tipo salvaje descritas anteriormente inmovilizadas sobre la misma para reacciones para producir fludarabina en presencia de DMSO, DMF y THF.

El THF se elimina inmediatamente ya que la 2'-fluoroadenina es prácticamente insoluble en él, incluso a concentraciones muy bajas.

Se añade 1 ml de mezcla de reacción a 60°C que consiste en: 2-fluoroadenina 4 mM; Ara-U 6 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM; DMSO o DMF al 20%, a 250 mg de resina que contiene las células de *E. coli* inmovilizadas.

## ES 2 343 741 T3

Se llevan a cabo diferentes reacciones usando la misma resina

Muestra (1 <sup>a</sup> reacción 20 h)	2-F-Adenina → Fludarabina	Ara-U → Uracilo
Reacción en DMSO	70%	77%
Reacción en DMF	65%	75%

Muestra (2 <sup>a</sup> reacción 48 h)	2-F-Adenina → Fludarabina	Ara-U → Uracilo
Reacción en DMSO	73,4%	72,3%
Reacción en DMF	63,6%	70,5%

Muestra (3 <sup>a</sup> reacción 6 días)	2-F-Adenina → Fludarabina	Ara-U → Uracilo
Reacción en DMSO	72%	73,7%
Reacción en DMF	68,3%	76%

Muestra (4 <sup>a</sup> reacción 20 h)	2-F-Adenina → Fludarabina	Ara-U → Uracilo
Reacción en DMSO	64%	59%
Reacción en DMF	68%	72%

La resina mantiene una buena actividad también después de 10 días totales de permanencia en la reacción a 60°C con altas concentraciones de ambos solventes.

El nuevo biocatalizador es entonces fácilmente reutilizable para diferentes ciclos de reacción con una pérdida de actividad muy ligera. Sin embargo, la actividad enzimática específica de las células a ser inmovilizadas no era aún demasiado alta y no permitía optimizar la reacción, puesto que aún se deben usar concentraciones bajas de sustrato, con un aumento consiguiente en los volúmenes de reacción.

Se usaron entonces nuevas cepas recombinantes capaces de expresar cantidades considerables de UPasa y PNPasa.

### 3. Construcción de cepas recombinantes que expresan la enzima UPasa o la enzima PNPasa

Se construyeron las cepas recombinantes transformando una cepa huésped de *Escherichia coli* con un plásmido de alto número de copia que contenía el gen de interés y un marcador para la selección.

La cepa huésped usada es la cepa DH5alfa, que está fácilmente disponible (GIBCO-BRL) en el mercado y bien descrita en la bibliografía. Es una cepa derivada de *Escherichia coli* K12, que se considera de seguridad de clase 1 y, por tanto, apropiada para un uso industrial.

El gen UdP, que codifica la enzima UPasa, y el gen deoD, que codifica la enzima PNPasa, ya se han descrito en la bibliografía y sus secuencias se conocen y están disponibles en las bases de datos del EMBL caracterizadas por los números de acceso, X15679 para UdP y M60917 para deoD.

Los genes se amplificaron mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), usando cebadores sintéticos expresamente preparados.

Usando las enzimas de restricción adecuadas, KpnI y SalI para UdP y EcoRI y SalI para deoD, los genes se insertaron en la región poliligadora del plásmido de alto número de copia pUC18, que está bien caracterizado en la bibliografía y comercialmente disponible.

En ambos plásmidos (el que contenía el gen UdP y el que contenía el gen deoD) se insertó después resistencia al antibiótico kanamicina, obtenido mediante digestión con la enzima de restricción HindIII del plásmido pBSL14, comercialmente disponible.

## ES 2 343 741 T3

Por último, en ambos plásmidos (el que contenía el gen UdP y el que contenía el gen deoD) se eliminó la resistencia a ampicilina mediante delección, a través de digestión con la enzima *AvaII*.

5 Inesperadamente, se encontraron dos sitios reconocidos por la enzima de restricción *AvaII* con la formación subsecuente de 3 fragmentos de plásmido en lugar de los dos esperados, mientras que en la bibliografía sólo se describe un sitio de restricción para esta enzima.

10 Los plásmidos finales se obtuvieron recuperando los dos fragmentos más largos y eliminando el fragmento innecesario que se había formado. En la siguiente tabla se describen las características principales de las nuevas cepas genéticamente modificadas

TABLA

CEPA	Huésped	Plásmido	Marcador de selección	Proteína expresada	Presencia de AmpR
EXP05/03	DH5alpha	pUC18	kanamicina	UPasa	No
EXP05/04	DH5alpha	pUC18	kanamicina	PNPasa	No

25 Las secuencias de los plásmidos en la tabla anterior se describen en las listas al final de la descripción y particularmente la secuencia del plásmido pUC18 que contiene el gen UdP corresponde a Seq. Id. No. 1 y la secuencia de del plásmido pUC18 que contiene el gen deoD corresponde a la Seq. Id. No. 2.

*Fermentación de las cepas recombinantes que expresan la enzima UPasa o la enzima PNPasa*

30 Las cepas recombinantes denominadas EXP05/03 (que expresa la enzima UPasa) y EXP05/04 (que expresa la enzima PNPasa) se fermentaron por separado en lotes, usando un fermentador con un volumen útil de 15 litros que contenía 15 l de medio de cultivo con la siguiente composición (por litro):

3,2 g de  $K_2HPO_4$

35 0,6 g de  $KH_2PO_4$

20 g de soytona;

40 36 g de extracto de levadura;

1,0 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ;

45 0,02 g de kanamicina.

El fermentador se inoculó con alrededor de 150 ml de suspensión bacteriana previamente hecha crecer alrededor de 24 horas a 37°C. La fermentación se llevó a cabo usando los siguientes parámetros: temperatura 37°C, agitación mecánica a aproximadamente 250 revoluciones/minuto, flujo de aire automáticamente controlado para mantener el valor de la  $pO_2$  al 20% de la concentración de saturación, pH controlado a  $7 \pm 0,2$  mediante la adición de una solución de amoníaco al 10% o una solución de ácido fosfórico al 20%.

Una vez terminada la fermentación (completada en alrededor de 24 horas) se recogió la pasta celular mediante centrifugación, se lavó con tampón fosfato de potasio 100 mM a pH 7,0, se recogió de nuevo mediante centrifugación y se mantuvo como pasta celular húmeda a una temperatura de -20°C.

55 4. *Actividades enzimáticas de las cepas recombinantes que expresan la enzima UPasa o la enzima PNPasa*

Se describen las actividades de las células obtenidas de fermentaciones de 15 litros

CEPA	Actividad UPasa (U/g) *	Actividad PNPasa (U/g) *
EXP05/03 F1 (UP)	2000	6
EXP05/03 F2 (UP)	2000	//
EXP05/04 F1 (PNP)	10	400

## ES 2 343 741 T3

EXP05/04 F2 (PNP)	//	245
EXP05/04 F3 (PNP)	//	340
EXP05/04 F4 (PNP)	//	340

\* U/g = unidades por gramo de peso húmedo

10 Las actividades enzimáticas de las cepas recombinantes se determinan tanto singularmente, mediante reacciones de fosforolisis de sustratos naturales, como acopladas con una reacción estándar en donde se transfiere un azúcar de una base de pirimidina a una purina. La reacción usada, que es básicamente una prueba de uso práctico, incluye la transferencia del azúcar de la base pirimidínica uracilo (Ara-U = azúcar + base) a la base purínica adenina (con formación de Ara-A). Esta reacción se usa porque es bien conocida y está descrita en la bibliografía y es funcional desde un punto de vista operativo.

### 5. Determinación de la actividad enzimática debido a la enzima UPasa

20 Se añade una cantidad conocida (100 ó 200 microlitros) de una suspensión de células que expresan UPasa, diluidas 1:100 ó 1:1000 como peso húmedo/volumen en tampón fosfato de potasio a pH 7,0-7,2, a 800 microlitros de solución de uridina 75 mM en tampón fosfato 100 mM a pH 7,0-7,2, preincubado a 30°C. Exactamente 5 minutos después, la reacción de fosforolisis se para mediante la adición de 1 ml de HCl 2N. Se analiza una alícuota de la mezcla de reacción usando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), equipado con una columna Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel), con un tamaño de 250 x 4,6 mm. La elución se lleva a cabo usando una solución de fosfato monobásico 10 mM - metanol al 6%.

30 La actividad enzimática de la pasta celular se expresa como unidades/gramo de peso húmedo (micromoles transformados cada minuto por 1 gramo de pasta celular húmeda) y se calcula respecto a una curva patrón construida con las cantidades de uracilo formadas en las mismas condiciones del ensayo usando cantidades crecientes de la misma pasta celular.

### 6. Determinación de la actividad enzimática debido a la enzima PNPasa

35 Se añade una cantidad conocida (100 ó 200 microlitros) de una suspensión de células que expresan PNPasa, diluidas 1:100 ó 1:1000 como peso húmedo/volumen en tampón fosfato de potasio a pH 7,0-7,2, a 800 microlitros de solución de inosina 60 mM en tampón fosfato 100 mM a pH 7,0-7,2, preincubado a 30°C. Exactamente 10 minutos después, la reacción de fosforolisis se para mediante la adición de 1 ml de HCl 2N. Se analiza una alícuota de la mezcla de reacción usando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), equipado con una columna Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel), con un tamaño de 250 x 4,6 mm. La elución se lleva a cabo usando una solución de fosfato monobásico 10 mM - metanol al 6%.

45 La actividad enzimática de la pasta celular se expresa como unidades/gramo de peso húmedo (micromoles transformados cada minuto por 1 gramo de pasta celular húmeda) y se calcula respecto a una curva patrón construida con las cantidades de hipoxantina formadas en las mismas condiciones del ensayo usando cantidades crecientes de la misma pasta celular.

### 7. Determinación de la actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas

50 Se determina la actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas en la mezcla de las suspensiones celulares antes de la inmovilización, en las aguas de lavado después de la inmovilización y en el soporte sólido mediante una reacción de transglicosilación llevada a cabo usando condiciones estandarizadas.

55 Se añadieron 50-100 microlitros de la mezcla de suspensiones celulares o de las aguas de lavado después de la inmovilización a 1 ml de mezcla de reacción mientras que se añaden 200 ó 400 mg (peso húmedo) de soporte sólido que tiene células inmovilizadas en el mismo que contienen la actividad enzimática UPasa y la actividad enzimática PNPasa a 10 ml de mezcla de reacción.

60 La reacción se lleva a cabo usando la siguiente solución: arabinofuranosil-uracilo (Ara-U) 40 mM, adenina 40 mM, fosfato de potasio monobásico 30 mM - pH 7,0-7,2 a una temperatura controlada de 60°C. Después de 60 minutos a 60°C, la reacción se para diluyendo la reacción en agua 1:50 y enfriando a 4°C. Se determina el porcentaje de adenina convertido en arabinofuranosil-adenina (ARA-A) analizando una alícuota de las mezclas de reacción usando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), equipado con una columna Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel), con un tamaño de 250 x 4,6 mm, eluyendo con una solución de fosfato monobásico 10 mM - metanol al 6%. La actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas (actividad catalítica de transglicosilación) se expresa en unidades/gramo (micromoles de adenina convertidos cada minuto para formar Ara-A en las condiciones del ensayo/gramo de peso húmedo de pasta celular) y se calcula con respecto al porcentaje de conversión de adenina.

## ES 2 343 741 T3

### 8. Prueba de diferentes resinas para la inmovilización de la enzima

Se realizan pruebas de inmovilización con diferentes tiempos de contacto entre la mezcla de las suspensiones celulares y diferentes tipos de resinas usadas para la inmovilización de las enzimas.

Se usaron las siguientes resinas (Rohm & Haas): Duolite A568; Duolite A7; Amberlite FPA54; Amberlite FPC3500; Amberlite XAD761; Dowex MWA1, Amberlyst 21; Diaion WA30, Amberlite IRA67.

Se añadieron 10 ml de una mezcla de suspensiones celulares en tampón fosfato de potasio 0,5 M a pH 7,5 con concentración de actividad enzimática UPasa de alrededor de 67 unidades/ml y actividad enzimática PNPasa de alrededor de 23 unidades/ml a 1 gramo seco de cada resina (2 gramos húmedos para Amberlite IRA67, suministrada de esta manera). La actividad catalítica de las dos fosforilasas acopladas fue aproximadamente de 2,65 U/ml.

Las mezclas de incubación se dejaron con agitación suave durante alrededor de 72 horas.

Las resinas se filtraron y analizaron usando reacciones estándar (párrafo 7).

Resina	Matriz soporte	Grupo funcional	Capacidad	Cantidades recuperadas	Actividad específica	% de captación
Duolite A7				1,3 g	3,1 U/g	15,7%
Duolite A568	Fenol-formaldehído	Amina terciaria	1,2 meq/ml 3,9 meq/g	2,6 g	6,6 U/g	64,7%
Amberlite FPA54				1,3 g	2,2 U/g	11,5%
Amberlite FPC3500				2,5 g	0,2 U/g	2,3%
Amberlite XAD761				1,3 g	0,3 U/g	1,6%
Dowex MWA1	Estireno-divinilbenceno	Amina terciaria	1,0 meq/ml 3,5 meq/g	1,3 g	2,8 U/g	13,7%
Amberlyst 21	Estireno-divinilbenceno	Alquilamina	1,5 meq/ml 4,7 meq/g	1,3 g	2,4 U/g	11,8%
Diaion WA30	Estireno-divinilbenceno	Amina terciaria	1,5 meq/ml 3,0 meq/g	1,3 g	3,0 U/g	14,7%
Amberlite IRA67	Estireno-divinilbenceno	Amina terciaria	1,6 meq/ml 5,6 meq/g	1,3 g	0,6 U/g	2,9%

Duolite A568 demostró ser la mejor resina con un porcentaje de inmovilización de actividad en la resina superior al 60% en las condiciones descritas.

### 9. Coinmovilización de cepas recombinantes que expresan la enzima UPasa y la enzima PNPasa

Se estudiaron después las mejores condiciones para la coinmovilización de células genéticamente modificadas en un soporte sólido.

#### 9.1. Relación entre las actividades enzimáticas UPásica y PNPásica

La disponibilidad de células que contienen altas cantidades de UPasa y PNPasa permite la modulación de las dos actividades enzimáticas para optimizar la reacción catalizada mediante el acoplamiento de las dos enzimas.

Se prepararon mezclas de suspensiones celulares de las dos cepas de tal manera que se tuvieran relaciones de actividad (expresadas en unidades/gramo húmedo) según los párrafos 5 y 6 iguales a:

UP/PNP=0,5; UdP/PNP=1; UdP/PNP=2; UdP/PNP=3; UdP/PNP=6.

Se probó la capacidad de las mezclas de suspensiones de realizar una reacción estándar siendo todas las cantidades iguales (véanse los párrafos 6 y 7).

## ES 2 343 741 T3

La mejor condición demostró ser esa con una relación UdP/PNP igual a 3, ligeramente superior con respecto a la relación UdP/PNP igual a 2, que sin embargo se prefiere ya que necesita una cantidad menor de pasta celular con PNPasa (la enzima PNPasa se expresa en una cantidad menor con respecto a la enzima UPasa).

### 5 9.2. *Concentración de la actividad enzimática UPasa*

Se llevan a cabo pruebas de inmovilización con diferentes concentraciones de UPasa en la mezcla de suspensiones celulares comprendidas entre 30 y 150 U/ml de suspensión (en las condiciones de la prueba descrita en el ejemplo 5). La mejor condición respecto a la actividad del soporte inmovilizado y la actividad perdida en el lavado es esa con  
10 alrededor de 75 U/ml de suspensión.

### 9.3. *Concentración de la actividad enzimática PNPasa*

Se llevan a cabo pruebas de inmovilización con diferentes concentraciones de PNPasa en la mezcla de suspensiones celulares comprendidas entre 15 y 75 U/ml de suspensión (en las condiciones de la prueba descrita en el ejemplo 6). La mejor condición respecto a la actividad del soporte inmovilizado y la actividad perdida en el lavado es esa con  
15 alrededor de 25 U/ml de suspensión.

### 20 9.4. *Relación entre la actividad enzimática UPasa y PNPasa y cantidad de resina*

Se llevan a cabo pruebas de inmovilización con relaciones entre actividad enzimática UPasa y PNPasa de la mezcla de suspensiones celulares y cantidad de resina comprendidas entre 330 y 1330 unidades/gramo seco de resina para UPasa y entre 150 y 660 unidades/gramo seco de resina para PNPasa.

La mejor condición respecto al soporte inmovilizado y la actividad perdida durante el lavado se da mediante la inmovilización de una mezcla de suspensiones celulares con alrededor de 750 unidades/gramo seco de resina para UPasa y alrededor de 250 unidades/gramo seco de resina para PNPasa.

### 30 9.5. *Concentración de la actividad catalítica de las dos fosforilasas acopladas*

Se realizaron pruebas de inmovilización con concentraciones de actividad catalítica de las dos fosforilasas acopladas (en las condiciones de la prueba descrita en el ejemplo 7) comprendidas entre 1 unidad/ml de mezcla de suspensión celular y 8 unidades/ml de mezcla de suspensión celular. La mejor condición para la actividad de la resina inmovilizada es esa con 5 unidades/ml de mezcla de suspensión celular.

### 35 9.6. *Relación entre la actividad catalítica de las dos fosforilasas acopladas y la cantidad de resina seca*

Se realizan pruebas de inmovilización con relaciones entre la actividad catalítica de las dos fosforilasas acopladas y la cantidad de resina comprendida entre 30 y 80 unidades/gramo seco de resina (condición seleccionada: alrededor de 50 unidades/gramo seco de resina).

La mejor condición respecto a la actividad de la resina inmovilizada y la actividad perdida en el lavado es esa con 50 unidades por gramo seco de resina.

### 45 9.7. *Relación entre cantidad de células y peso de resina*

Se realizan pruebas de inmovilización con relaciones entre cantidades de células (como peso húmedo) y cantidad de resina (como peso seco) comprendidas entre 0,5:1 y 2:1.

Se encontró que la mejor condición era esa con una relación 1:1 entre peso de la pasta celular y peso de la resina.

### 9.8. *Concentración de sal del tampón de inmovilización*

Se realizan pruebas de inmovilización con mezclas de suspensiones celulares en tampones con diferente molaridad de fosfato de potasio monobásico a pH 7,4, el pH fisiológico y óptimo para las actividades enzimáticas. Las suspensiones se prepararon en tampones 0 M, 0,1 M, 0,5 M y 1 M.

La condición seleccionada es la que implica el uso de tampón fosfato de potasio monobásico 0,5 M.

### 60 9.9. *Tiempo de inmovilización*

Se realizan pruebas de inmovilización con diferentes tiempos de contacto entre la mezcla de suspensiones celulares y la resina. Se usaron periodos de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 6 días y 2 semanas. Los mejores resultados se obtienen dejando la mezcla de suspensión celular en incubación con la resina durante no menos de 72 horas. No se advirtieron  
65 ni descensos en la actividad enzimática ni otras contraindicaciones después de tiempos de inmovilización tan largos como de hasta dos semanas.

La resina se analiza después respecto a los parámetros de la aplicación principal.

## ES 2 343 741 T3

### 10. Intervalo de pH

Se realizaron pruebas, que implican llevar a cabo reacciones subsecuentes a diferentes valores de pH para evaluar el intervalo en el que la actividad enzimática de la resina es reutilizable.

Se llevaron a cabo reacciones estándar (véase el párrafo 7) a valores de pH iguales a:

4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0.

Se llevaron a cabo reacciones posteriores adicionales para cada valor de pH descrito anteriormente para evaluar, en cada caso, el mantenimiento de la actividad con respecto a la primera reacción. La actividad enzimática de las células inmovilizadas se mantiene en el intervalo de pH comprendido entre pH 5,0 y pH 9,0 y preferiblemente entre pH 6,0 y pH 9,0.

### 11. Temperatura de inactivación

Se realizan pruebas, que implican llevar a cabo reacciones posteriores a diferentes valores de temperatura para verificar la inactivación del biocatalizador. Se llevaron a cabo reacciones estándar a temperatura de 70°C, 75°C y 80°C (véase párrafo 7). La actividad enzimática se mantiene en reacciones posteriores también a 70°C mientras que desciende a 75°C (se pierde el 50% de la actividad) y se pierde por completo a 80°C.

### 12. Coimmobilización de células que contienen la enzima UPasa y células que contienen la enzima PNPasa

La inmovilización de suspensiones celulares que contienen la actividad enzimática UPasa y la actividad enzimática PNPasa se prepara empezando de una mezcla de suspensiones celulares preparadas de tal manera que tengan una relación entre la actividad enzimática de la enzima UPasa y la actividad enzimática de la enzima PNPasa comprendida entre 1:1 y 3:1. En este ejemplo se describe la coimmobilización de una mezcla de suspensiones celulares en donde la relación entre la actividad enzimática de la enzima UPasa y la actividad enzimática de la enzima PNPasa es alrededor de 3:1.

Se añaden alrededor de 19 gramos de resina Duolite A568 de Rohm & Haas (peso seco) a 190 ml de una mezcla de suspensiones celulares compuesta por 6,25 gramos de células EXP05/03 (UP) como peso húmedo y 18,2 gramos de células EXP05/04 (PNP).

La suspensión celular se había preparado en tampón fosfato de potasio 0,5 M a pH 7,5 y tenía una concentración de actividad enzimática UPasa igual a alrededor de 115 unidades/ml y una actividad enzimática PNPasa igual a alrededor de 33 unidades/ml. La actividad catalítica de las dos fosforilasas acopladas era alrededor de 4,7 U/ml.

La suspensión células/resina se mantiene a temperatura ambiente con agitación suave durante 48 horas. La resina inmovilizada se filtra después al vacío y se lava completamente con agua desionizada hasta que se obtienen aguas de lavado transparentes (alrededor de 2 litros).

Se recuperaron alrededor de 65 gramos de resina húmeda, con una actividad específica igual a alrededor de 7,5 U/gramo húmedo y con una inmovilización de más del 50% de la actividad inicial.

La resina con las actividades enzimáticas inmovilizadas se mantiene entonces a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,5.

### 13. Reacciones de bioconversión catalizadas por una resina que tiene células que contienen UPasa y PNPasa coimmobilizadas en la misma

#### a) Preparación de adenosina

Se añaden 10 ml de una solución de 2'-desoxiuridina 60 mM y adenina 20 mM en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1 a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo, calculado como en el párrafo 7, la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada. Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para purificar la adenosina.

La resina se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo.

El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 80%.

#### b) Preparación de arabinofuranosil-diaminopurina (Ara-DAMP)

Se añadieron 10 ml de una solución con la siguiente composición: Ara-U (beta-D-arabinofuranosil-uracilo) 60 mM, diaminopurina 20 mM; en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1, a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con

## ES 2 343 741 T3

una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

5 Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de Ara-DAMP.

La resina con el biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo. El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 80%.

10

### c) Preparación de 2'-desoxiadenosina

Se añadieron 10 ml de una solución con la siguiente composición: 2'-desoxiuridina 60 mM, adenina 20 mM; en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1, a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

15

Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de 2'-desoxiadenosina.

20

La resina con el biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo. El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 80%.

### d) Preparación de 2'-desoxiguanosina

Se añadieron 10 ml de una solución con la siguiente composición: 2'-desoxiuridina 20 mM, guanina 5 mM; en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1, a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

30

Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de 2'-desoxiguanosina.

35 La resina con el biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo. El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 80%.

### e) Preparación de 2'-desoxidiaminopurina

40

Se añadieron 10 ml de una solución con la siguiente composición: 2'-desoxiuridina 20 mM, 2'-desoxidiaminopurina 5 mM; en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1, a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

45

Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de 2'-desoxidiaminopurina.

50 La resina con el biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo. El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 80%.

### f) Preparación de mizorribina (Bredinina)

55 Se añadieron 10 ml de una solución con la siguiente composición: uridina 60 mM, carbamoil-imidazolona 20 mM; tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1, a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

60 Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de mizorribina.

La resina con el biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo. El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 80%.

65

## ES 2 343 741 T3

### g) Preparación de arabinofuranosil-adenina (Ara-A)

Se añadieron 10 ml de una solución con la siguiente composición: Ara-U 40 mM, adenina 40 mM; en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1, a 0,2 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 7,5 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

Después de 1 día a 60°C, la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de Ara-A.

La resina con el biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar inmediatamente para una reacción posterior o se puede recuperar y mantener a 4°C en tampón fosfato de potasio 0,1 M hasta su uso sucesivo. El rendimiento de bioconversión fue alrededor del 70%.

### 14. Reacciones para fludarabina con resina de células recombinantes que contiene UPasa y PNPasa coinmovilizadas

Se añaden 500 ml de una solución a 60°C con la siguiente composición: Ara-U 75 mM, adenina 50 mM, en tampón fosfato de potasio 30 mM a pH 7,1 que contiene DMSO al 30%, a 18 gramos de resina (peso húmedo) con una actividad catalítica de las enzimas UPasa y PNPasa acopladas igual a alrededor de 12,7 unidades/gramo (párrafo 7), la resina recién filtrada y lavada con agua desionizada.

La reacción se realiza a 60°C durante 20 horas, después la resina con el biocatalizador inmovilizado se separa y el material filtrado se procesa para la purificación de fludarabina.

La resina con el biocatalizador inmovilizado se reutiliza inmediatamente para una reacción posterior realiza con el mismo método. Se realizan 10 reacciones consecutivas reutilizando la misma resina.

No. de reacción posterior (20 h)	2-F-adenina → Fludarabina	Ara-U → Uracilo
1 <sup>a</sup> reacción	82,1%	54,0%
2 <sup>a</sup> reacción	81,4%	53,5%
3 <sup>a</sup> reacción	82,5%	54,4%
4 <sup>a</sup> reacción	82,0%	54,0%
5 <sup>a</sup> reacción	78,0%	54,5%
6 <sup>a</sup> reacción	83,7%	54,8%
7 <sup>a</sup> reacción	80,5%	55,6%
8 <sup>a</sup> reacción	82,1%	54,3%
9 <sup>a</sup> reacción	80,4%	51,5%
10 <sup>a</sup> reacción	80,0%	52,1%

La resina en estas condiciones es capaz de realizar al menos 10 reacciones a alta temperatura con altas concentraciones de solvente con una larga permanencia de 10 días a 60°C. La pérdida de actividad es insignificamente pequeña o en cualquier caso bastante limitada. De esta manera, está disponible un biocatalizador de interés industrial notable para la producción de nucleósidos y análogos de los mismos y en general para reacciones de bioconversión.

### Referencias bibliográficas

1. Ramakrishna S.V., Prakasham R.S. "Microbial fermentations with immobilized cells", *Current science.*, 1999, 77 Vol. 1, 87-100.

2. Novarro J.M., Durand G., *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 1977, 4, 243-254.

3. Kennedy J.F., Cabral J.M.S., *Immobilized Cells and Enzymes* (ed. Woodward, J.) *IRL Press*, 1985, 19-37.

4. Chibata I *et al*, JP 7425189, 1974.

5. Hottori T., Furusaka C., *J. Biochem.*, 1960, 48, 821-837.

## ES 2 343 741 T3

6. **Hottori T., Furusaka C.**, *J. Biochem.*, 1961, 50, 312-315.
7. **Porter J.T., Short S.A.**, *Journal Biological Chemistry*, 1995, 270 (26), 15557-15562, 1995.
- 5 8. **Okuyama K., Noguchi T.**, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64 (10) 2243-2245.
9. **Hutchinson D.W.**, *Trends Biotechnolog.*, 1990, 8, 348-353.
10. **Hanrahan J.R., Hutchinson D.W.**, *J. Biotechnol.*, 1992, 23, 193-210.
11. **Krenitsky T.A.**, 1979, EP 0 002 192.
12. **Krenitsky T.A. et al.**, *Biochemistry*, 1981, 20, 3615-3621.
- 15 13. **Krenitsky T.A. et al.**, *Carbohydrate Research*, 1981, 97, 139-146.
14. **Krenitsky T.A. et al.**, *J. Med. Chem.*, 1986, 29,138-143.
15. **Takehara M. et al.**, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1995, 50(10), 1987-1990.
- 20 16. **Bestetti G. et al.**, US 6.911.341 B2.
17. **Utagawa T. et al.**, *Agric. Biol. Chem.*, 1985, 49, 3239-3246.
- 25 18. **Utagawa T. et al.**, *Molec. Catalysis Enzymatic.*, 1999, 6 (3-4), 215-222.
19. **Cotticeli G. et al.**, *Nucleosides & Nucleotides*, 1999, 18 (4-5), 1135-1136.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un proceso para la producción de nucleósidos, que comprende la reacción de una pentosa-1-fosfato con una base de purina o pirimidina, **caracterizado** porque dicha reacción está catalizada por células productoras de uridina fosforilasa (UPasa) y/o purina nucleósido fosforilasa (PNPasa), que se han inmovilizado adsorbiendo dichas células en una resina de intercambio aniónico débil, en donde dichas células son células de *Escherichia coli* y dicha resina es Duolite A568®.

10 2. Un proceso para la transglicosilación de nucleósidos, que comprende una reacción entre

a) un nucleósido de pirimidina y una base de purina o

b) entre un nucleósido de purina y una base de pirimidina o

15 c) entre una base de purina y un nucleósido de purina que contiene una base de purina diferente o

d) entre una base de pirimidina y un nucleósido de pirimidina que contiene una base de pirimidina diferente

20 en donde dicha reacción está catalizada por células productoras de UPasa y células productoras de PNPasa o por células productoras de UPasa y PNPasa, **caracterizado** porque dichas células se inmovilizan adsorbiendo dichas células en una resina de intercambio aniónico débil, en donde dichas células son células de *Escherichia coli* productoras de UPasa y células de *Escherichia coli* productoras de PNPasa y dicha resina es Duolite A568®.

25 3. Un proceso según la reivindicación 2, en donde dicha reacción se produce entre 2'-fluoroadenina y arabinofuranosil-uracilo y produce fludarabina.

4. Un proceso según la reivindicación 1 ó 2, en donde dichas células de *Escherichia coli* son células de la cepa DH5alfa transformadas con los vectores plásmidos que tienen las secuencias descritas en Seq. Id. No. 1 y 2.

30 5. Un proceso según la reivindicación 4, en donde dichas células se coinmovilizan en la resina.

6. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación entre el peso húmedo de dichas células y el peso seco de dicha resina está comprendida entre 0,5:1 y 2:1 y es preferiblemente alrededor de 1:1.

35 7. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se inmovilizan dos tipos diferentes de células al mismo tiempo, en donde dichos dos tipos de células son células de *Escherichia coli* productoras de UPasa y células de *Escherichia coli* productoras de PNPasa.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 343 741 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> EXPLORA LABORATORIES SA

5 <120> UN PROCESO PARA LA INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS EN RESINAS

<130> EXP001BEP

10 <160> 2

<170> PATENTIN VERSIÓN 3.3

15 <210> 1

<211> 4454

<212> ADN

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PLÁSMIDO

25

<220>

<221> GEN

<222> (49).. (843)

30 <223> RESISTENCIA A KANAMICINA

<220>

<221> GEN

35

<222> (1285)..(2046)

<223> UDP

40 <400> 1

**TGTA AACGA CGGCCAGTGC CAAGCTTGGG CGAACCCAG AGTCCCGCTC AGAAGA ACTC 60**

45

**GTCAAQAAGG CGATAGAAGG CGATGCGCTG CQAATCGGGA GCGGCGATAC CGTAAAGCAC 120**

50

55

60

65

# ES 2 343 741 T3

GAGGAAGCG TCAGCCCAT TCGCCCAAG CTCTTCAGCA ATATCACGGG TAGCCAACGC 180

5 TATGTCTGA TAACGGTCCG CCACACCCAG CCGCCACAG TCGATGAATC CAGAAAAGCG 240

10 GCCATTTTC ACCATGATAT TCGGCAAGCA GGCATCGCCA TGGGTACGA CGAGATCCTC 300

15 CCCGTGGGG ATCCGGCCT TGAGCCTGGC GAACAGTTCG GCTGGCCGA GCCCTGATG 360

20 CTCTCGTCC AGATCATCT GATCOACAAG ACCGGCTTC ATCCGATAC GTGCTCGCTC 420

25 GATGGATGT TTCGCTTGGT GGTGCAATGG GCAGGTAGCC GCATCAAGCG TATGCAGCCG 480

30 CCGCATGCA TCAGCCATGA TGGATACTTT CTCGGCAGGA GCAAGGTGAG ATGACAGGAG 540

35 ATCTGCCCC GGCACCTGC CCAATAGCAG CCAGTCCCTT CCCGCTCAG TGACAACGTC 600

40 GAGCACAGCT GCGCAAGGAA CGCCGTCGT GGCCAGCCAC GATAGCCCG CTGCCTCGTC 660

45 TTGGAGTCA TTCAGGGCAC CGGACAGGTC GGTCTTGACA AAAAGAACC GCGGCCCTG 720

50 CGCTGACAG CGAACACGG CGGCATCAGA GCAGCCGATT GTCTTTGTG CCCAGTCATA 780

55 GCCGAATAG CTCTCCACC AAGCGGCCGG AGAACCTGC TGCAATCCAT CTTGTTCAAT 840

60 CATGCGAAC GATCCTCATC CTGTCTCTG ATCAGATCTT GATCCCCTGC GCCATCAGAT 900

65 CCTGGCGGC AAGAAAGCCA TCCAGTTTAC TTTGAGGGC TTCCCAACCT TACCAGAGG 960

1020 CGCCCAGCT GGCAATCCG GTTCGCTTG TGTCCATAAA ACCGCCAGT CTAGCTATCG 1080

1140 CCATGTAAG CCACTGCAAG CTACCTGCTT TCTCTTGGC CTTGCGTTT CCCTGTCCA 1140

GATAGCCCAG TAGCTGACAT TCATCCGGG TCAGCACCGT TTCTGCGGAC TGGCTTTCTA 1140

ES 2 343 741 T3

CGTGTTCCGC TTCCTTTAGC AGCCCTTGCG CCCTGAGTGC TTGCCGCAGC GTGAAGCTAG 1200

5 CGGAATTCGA GCTCGGTACC CCGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA TGCAAGCTTG 1260

10 CATGCCTGCA GGTCGACAAG AGAATTACAG CAGACGACGC GCCGCTTCCA CCACGATTTT 1320

CACCCATGG CTTTCGGTTT GTTTCATCGT CTCAGCATTG GGGATCTCTT GCTGGGTGCG 1380

15 GTTAACGATA ACACCCGCTA CCATACCGGC ACGCAGGCCG TGAATTGCAC ACATGGTCAG 1440

20 CAGGGTTGCA GATTCCATTT CATAGTTCAT TACGCCATC GCCTGCCACT CTCCATAGA 1500

25 ACCTTTAAAG TGACGAACTA CGCGACCAGA GTAAGTATCG TAACGTTCTT GACCTGGGTA 1560

GAAGGTATCA GAAGAAGCTG TCACGCCAAC GTGAGTTGTC GCGCCAATGG ATTCGCAGC 1620

30 TTCAACCAGC GCAGTCGTAC ATTCGAAATC AGCGACAGCC GCGAATCCA GCGGTGCGAA 1680

35 GTGCAGGCTC GCGCCATCCA GACCGACAGA CGCCGTGGTA ACCAGGACAT CACCCACATT 1740

AATATCGGC TGAATAGCGC CCGTTGTACC GATACGCAGG AAGGTGCGAA TGCCAGCTG 1800

40 TGCCAGCTCT TCAACAGCAA TAGAGGTAGA CCGGCCCCCG ATACCGGTAG AGCAGACGAT 1860

45 AACAGTTTA CCATCCAGCT CTGCACCCA GGTAGTGAAT TCGCGGTGAG ATGCCAGCTT 1920

50 AACCGCTTA TCCATCAGCG CGCCGATCTT TTCCACACGA TCCGGGTCCG CAGGGACGAT 1980

55 GGCAAGCGTA GCCCCTTGT AATCGTTTTT AGTGAGGCCG AGATGAAAAA CATCAGACTT 2040

OGACATGGAT GGTACCGAGC TCGAATTCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 2100

60 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAAG TOTAAAGCCT 2160

65 GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTCC 2220

# ES 2 343 741 T3

AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG OGGAGAGGCG 2280

5 GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGGCG TCGGTGTTTC 2340

10 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGCGGTAAT ACGGTATCC ACAGAATCAG 2400

15 GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 2460

20 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 2520

25 GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGCACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 2580

30 CTGGAAGCTC CCTCGTGGCG TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 2640

35 CCTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCCCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 2700

40 CCGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGT CAGCCCCACC 2760

45 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AQTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 2820

50 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 2880

55 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG 2940

60 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAAAAAA 3000

65 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGCG AGAAAAAAG 3060

GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CCGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 3120

CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTCACCTAG ATCCTTTTAA 3180

ATTA AAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 3240

# ES 2 343 741 T3

ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 3300

5 TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 3360

10 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 3420

15 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG 3480

20 CCGCAGTGT ATCACTCATG OTTATGCCAG CACTOCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT 3540

25 CCGTAAGATG CTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA 3600

30 TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCCGGCT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA 3660

35 GAACTTAAA AGTGCTCATC ATTGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT 3720

40 TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT 3780

45 CTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAT GCCGCAAAA 3840

50 AGGGAATAAG GCGACACGG AATGTTGAA TACTCATACT CTCCTTTTT CAATATTATT 3900

55 GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA 3960

60 ATAAACAAAT AGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA 4020

65 CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCGTCTCG 4080

CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG 4140

CTGTCTGTA AGCGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCCTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG 4200

GCGGGTGTGG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC 4260

# ES 2 343 741 T3

ATATGCGGTG TGAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCCCATC AGGCGCCATT 4320

5 CGCCATTCAG GCTGCGCAAC TGTGGAAG GCGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC 4380

10 GCCAGCTGGC GAAAGGGGA TGTGCTGCAA GCGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT 4440

CCCAGTCACG ACGT 4454

15 <210> 2

<211> 4393

<212> ADN

20 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PLÁSMIDO

25

<220>

<221> GEN

<222> (438)..(1232)

30 <223> RESISTENCIA A KANAMICINA

<220>

<221> GEN

35

<222> (1277)..(1977)

<223> DEOD

40 <400> 2

TGTAAAACGA CGGCCAGTGC CAAGCTTGCA TGCCTGCAGG TCGACTCTAG AGGATCCCCG 60

45

GGTACCGAGC TCGAATTCCG CTAGCTTCAC GCTGCCGCAA GCACTCAGGG CGCAAGGGCT 120

50 GCTAAAGGAA GCGGAACACG TAGAAAGCCA GTCCGCAGAA ACGGTGCTGA CCCC GGATGA 180

55 ATGTCAGCTA CTGGGCTATC TGGACAAGGG AAAACGCAAG CCAAAGAGA AAGCAGGTAG 240

60

65

ES 2 343 741 T3

CTTGCAGTGG GCTTACATGG CGATAGCTAG ACTGGGCGGT TTTATGGACA GCAAGCGAAC 300  
5  
CGGAATTGCC AGCTGGGGCG CCCTCTGTA AGGTTGGGAA GCCCTGCAA GTAAACTGGA 360  
10  
TGGCTTCTT GCCGCCAAGG ATCTGATGGC GCAGGGGATC AAGATCTGAT CAAGAGACAG 420  
15  
GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG ATGGATTGCA CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT 480  
20  
GGGTGGAGAG GCTATTGGC TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG 540  
25  
CCGTGTCCG GCTGTCAGCG CAGGGGGCCG CGGTTCTTT TGTCAAGACC GACCTGTCCG 600  
30  
GTGCCCTGAA TGAAC TCCAA GACGAGGCAG CCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGCCG 660  
35  
TTCCTTGGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG 720  
40  
GCGAAGTGC GGGGCAGGAT CTCCTGT CAT CTCACCTTGC TCCTGCCGAG AAAGTATCCA 780  
45  
TCATGGCTGA TGCAATGGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC CCATTCCACC 840  
50  
ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTGATC 900  
55  
AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC CGAACTGTT GCCAGGCTCA 960  
60  
AGGCGCGGAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA TGCCGATGCC TGCTTGCCGA 1020  
65  
ATATCATGGT GAAAATGCC CGCTTTCTG GATTATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG 1080  
70  
CGGACCGCTA TCAGGACATA GCCTTGGCTA CCCGTGATAT TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG 1140  
75  
AATGGGCTGA CCGCTTCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC TCCCGATTCC CAGCGCATCG 1200  
80  
CCTTCTATCG CCTTCTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGACT CTGGGTTCCG CCCAAGCTTG 1260

# ES 2 343 741 T3

CATGCCTGCA GGTGACTTA CTCTTATCG CCCAGCAGAA CGGATTCCAG TCGGATTTG 1320

5 ATCATGTCGT TGAAGGTAGT CTGACGCTCA GCGGCAGTGG TCTGCTCGTG AGTGCCGATG 1380

10 TGGTCAGATA CGGTGCAGAT GGTGAGGGCT TTCGCGCCAA ATTCTGCAGC GACGCCGTAG 1440

15 ATACCAGCCG CTTCATTTC CACGCCGAGA ATGCCGTATT TTCCATCAC GTCGAACATT 1500

20 TCGCCGTCCG GAGAGTAGAA CAGGTCAGCG GAGAACAGGT TACCCACCGG AGCATCAATA 1560

25 CCCAGTGCTT TAGCTGCATC TACTGCGTTA CGCACCATGT CGAAGTCAGC GATAGCGGCA 1620

30 AAGTCATGGT CTTTAAAACG GATGCGGTTA ACTTTGGAAT CGGTGCAGGC ACCCATACCG 1680

35 ATAACGACGT CGCGCAGTTT TAGGTGCGGC AGAACTGCGC CACAGGAACC CACGCCGATA 1740

40 ATTTCTTCA CGCCGAAATC GGTGATCAGT TCTTTGGTGT AGATGGAGCA GGACGGGATA 1800

45 CCCATACCGT GACCCATTAC GGAATTTTG CGCCCTTGT AAGTACCGT GAAGCCCAGC 1860

50 ATACCGCGAA CGTTGTTTAC TTCACGGGCA TCTTCAAGGA AAGTTTCAGC AATATACTTC 1920

55 GCACGCAGCG GGTGCGCTGG CATCAAAACT ACCTCAGCGA AATCGCCCAT TTCTGCATTA 1980

60 ATGTGTGGG TAGCCATGGA AGAATTCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA 2040

65 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG 2100

GGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA 2160

GTCGGGAAAC CTGTGCTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCCCGG GGAGAGGCGG 2220

TTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTGCTTCG 2280

# ES 2 343 741 T3

GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAA GGGCGTAATA CGGTATCCA CAGAATCAGG 2340

5 GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA 2400

10 GGCCCGCTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC AAAAAATCG 2460

15 ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC 2520

20 TGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTC GACCCTGCCG CTTACGGAT ACCTGTCCGC 2580

25 CTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTC TCATAGCTCA CCTGTAGGT ATCTCAGTC 2640

30 GGTGTAGGTC GTTCGTCCA AGCTGGGCTG TGTCCAGAA CCCCCGTTG AGCCCGACCG 2700

35 CTGCGCCTA TCCGGTAACT ATCGTCTGA GTCCAACCCG GTAAGACAGG ACTTATCGCC 2760

40 ACTGGCAGCA GCCACTGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA 2820

45 GTTCTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG GTATCTGCCG 2880

50 TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAAACAAC 2940

55 CACCCCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG 3000

60 ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGOA ACGAAAACCTC 3060

65 ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA 3120

TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTTGGT CTGACAGTTA 3180

CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTCGTT CATCCATAGT 3240

TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG 3300

ES 2 343 741 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

TGCTGCAATG ATACCCCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA 3360

GCCAGCCGGA AGGCCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC 3420

CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC 3480

CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT 3540

GCGGCGACCG AGTTCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCQC CACATAGCAG 3600

AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAACTCT CAAGGATCTT 3660

ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTCAGCATC 3720

TTTTACTTTC ACCAOCGTTT CTGGGTOAGC AAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA 3780

GGGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG 3840

AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTAGAAAAA 3900

TAAACAAATA GGGGTTCQC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC 3960

CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTCGC 4020

GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG CTCCCGGAGA CGGTACACAG 4080

TTGTCTGTAA GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG GCGCGTCAG CCGGTGTTGO 4140

CGGGTGTCCG GGCTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA 4200

TATGCCGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GCGCCATTC 4260

GCCATTCAGG CTGCGCAACT GTTGGGAAGG OCGATCGGTG CCGGCCTCTT CGCTATTACG 4320

ES 2 343 741 T3

CCAGCTGGCC AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTC 4380

5

CCAGTCACGA CGT

4393

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65