



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 148 084**

②① Número de solicitud: 009801503

⑤① Int. Cl.⁷: C12P 7/42

/(C12P 7/42

C12R 1:19)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **14.07.1998**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2000**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.2000

⑦① Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de León**

⑦② Inventor/es: **García López, José Luis;
Díaz Fernández, Eduardo;
Ferrández Barca, Abel;
Luengo Rodríguez, José María;
Miñambres Rodríguez, Baltasar;
García Alonso, Belén y
Rodríguez Olivera, Elías**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Un procedimiento para la biotransformación del ácido fenilacético en ácido 2 - hidroxifenilacético.**

⑤⑦ Resumen:

Un procedimiento para la biotransformación del ácido fenilacético en ácido 2-hidroxifenilacético. La presente invención consiste en la realización de un procedimiento para producir ácido 2-hidroxifenilacético (2HPA) en *Escherichia coli*. La invención reivindica el uso los marcos de lectura abiertos implicados en el catabolismo del ácido fenilacético (PA) y responsables de la transformación de éste en su derivado hidroxilado en posición 2. La síntesis de 2HPA a partir de PA se consigue bloqueando la ruta catabólica de PA o mediante la expresión de los marcos de lectura abiertos que codifican algunas de las etapas del catabolismo de PA. El procedimiento de biotransformación se consigue tanto con células en crecimiento como con células en suspensión. El procedimiento es una alternativa, con muchas ventajas, al de la síntesis química de 2HPA.

ES 2 148 084 A1

DESCRIPCION

Un procedimiento para la biotransformación del ácido fenilacético en ácido 2 - hidroxifenilacético.

Sector de la técnica

La invención que se reivindica es un proceso de biotransformación que se encuadra fundamentalmente dentro del área de Biotecnología. Se trata de la producción de ácido 2-hidroxifenilacético (2HPA) a partir de ácido fenilacético (PA) mediante la expresión de algunos de los marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican enzimas involucradas en el catabolismo de PA en *E. coli*. Frente a la síntesis química de 2HPA, la síntesis que utiliza organismos vivos presenta las ventajas de la especificidad del proceso, la sencillez, el bajo coste económico y el ser un proceso respetuoso con el medio ambiente.

Estado de la técnica

El PA es un compuesto aromático muy abundante en la naturaleza y constituye un metabolito central en las rutas de degradación de otros compuestos aromáticos algunos de los cuales, como es el caso del estireno, son importantes contaminantes medioambientales (Mohamed M. y Fuchs, G. (1993) Arch. Microbiol. 159, 554-562). Los microorganismos poseen la capacidad de mineralizar una amplia variedad de compuestos aromáticos a través de rutas que convergen en unos pocos catabolitos centrales, uno de los cuales es el PA (Harayama, S. y Timmis, K.N. (1989) Genetics of Bacterial Diversity. Hopwood, D.A. y Chater, K.F. (Eds), pp. 151-174. Academic Press).

Escherichia coli es una bacteria que vive en el tracto intestinal de los mamíferos y en aguas y suelos ricos en materia orgánica de deshecho proveniente de los primeros. En estos dos hábitats *E. coli* encuentra una gran variedad de compuestos aromáticos derivados de plantas, aminoácidos y ácidos grasos que contienen grupos fenilo como sustituyentes (Ferrández, A., García, J.L. y Díaz, E. (1997) J. Bacteriol. 179, 2573-2581). Aunque la capacidad de *E. coli* para degradar PA en condiciones aeróbicas se describió por primera vez en 1983 (Burlingame, R., y Chapman, P.J. (1983) J. Bacteriol. 155, 113-121), el mecanismo de dicha degradación se desconoce hasta la fecha. Se ha sugerido que el PA es mineralizado en bacterias a través de su activación inicial a fenilacetil-coenzima A (PA-CoA) (Vitovski, S. (1993) FEMS Microbiol. Lett. 108, 1-6) y la enzima que cataliza dicha activación en *Pseudomonas putida* U ha sido recientemente caracterizada y el correspondiente gen clonado y secuenciado (Miñambres, B., Martínez-Blanco, H., Olivera, E.R., García, B., Díez, B., Barredo, J.L., Moreno, M.A., Schleissner, C., Salto, F. y Luengo, J.M. (1996) J. Biol. Chem. 271, 33531-33538). Sin embargo, nada se conoce de las etapas enzimáticas posteriores en el catabolismo de PA.

Estudios previos de nuestro grupo habían permitido el aislamiento de un mutante de la cepa *E. coli* W ATCC11105, la cual se encuentra depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo, incapaz de utilizar PA como única fuente de carbono. Dicho mutante, *E. coli* W14, se utilizó para la clonación de un fragmento de DNA de 33,3 kil-

opares de bases (kb) perteneciente al cromosoma de *E. coli* W y que confería a *E. coli* W14 la capacidad de utilizar PA como fuente de carbono. El plásmido que contiene el fragmento de DNA de 33,3-kb es un derivado de pBR322 y recibió el nombre de pFA2 (Ferrández, A., Prieto, M.A., García, J.L., y Díaz, E. (1997) FEBS Lett. 406, 23-27).

Es bien conocido que el catabolismo de los compuestos aromáticos en condiciones aeróbicas genera intermediarios hidroxilados (Harayama, S. y Timmis, K.N. (1989) En "Genetics of Bacterial Diversity". Hopwood, D.A. y Chater, K.F. (Eds), pp. 151-174. Academic Press). Por lo tanto, el bloqueo de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos puede originar la acumulación de derivados hidroxilados, y representa así una eficaz estrategia para la síntesis de dichos derivados. Mutantes de *E. coli* K-12 incapaces de crecer en PA como única fuente de carbono acumulan 2HPA en el medio de cultivo (Cooper, R.A., Jones, D.C.N. y Parrott, S. (1985) J. Gen. Microbiol. 131, 2753-2757). Aunque existen procesos para la síntesis química de 2HPA (Vallejos, J.C. y Yani, C. (1993) Process for preparation of ortho-hydroxyphenylacetic acid. Patente Francesa no. 2686877), hasta donde nosotros conocemos sólo se ha descrito una patente para la transformación de PA en 2HPA utilizando organismos vivos (Staudenmaier, H.R., Hauer, B., Ladner, W., Pressler, U. y Meyer, J. (1994) Fermentative manufacture of 2-hydroxyphenylacetic acid. Patente Alemana no 4232522), si bien no se ha descrito hasta la fecha ningún proceso para la biotransformación de PA en 2HPA en bacterias. En esta patente nosotros describimos un proceso para la biotransformación de PA en 2HPA en bacterias recombinantes.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención consiste en el diseño y realización de un procedimiento para producir 2HPA a partir de PA en *E. coli*, tanto en células recombinantes en crecimiento como con células en suspensión. La rapidez, facilidad y escaso coste de la fermentación de *E. coli* facilita la producción de 2HPA, y supone una considerable mejora respecto a la síntesis química de este compuesto. La invención reivindica los marcos de lectura abiertos (en lo sucesivo denominados ORF) que codifican la transformación de PA en 2HPA en *E. coli*, así como los procedimientos para el crecimiento y manipulación de las bacterias recombinantes productoras de 2HPA.

Descripción detallada de la invención

El fragmento de DNA clonado en pFA2 y que confiere al mutante *E. coli* W14 la capacidad de crecer en PA como única fuente de carbono, se sometió a un análisis con enzimas de restricción para determinar su mapa físico. La subclonación de un fragmento *HindIII/PstI* de 15,4-kb en el vector de bajo número de copias pCK01 permitió la obtención del plásmido pAAD, el cual seguía confiriendo a *E. coli* W14 la capacidad de crecimiento en PA. La secuenciación del inserto del plásmido pAAD mostró la existencia de varias ORFs cuya secuencia se ha depositado en el GenBank/EMBL Data Bank con

el número de acceso X97452. La interrupción de la ORF que hemos denominado *paaZ* mediante la inserción del transposón Tn1000 también denominado $\gamma\delta$ (Guyer, M.S. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 362-369) impide el crecimiento de *E. coli* W14 (pAAD::Tn1000 mutante 3) en PA como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, cuando *E. coli* W14 (pAAD::Tn1000 #3) se cultiva en medio mínimo M63 (Miller, J.H. (1972) En "Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor, New York) conteniendo glicerol como fuente de carbono y en presencia de PA, este último se transforma en 2HPA según se detecta en el análisis por cromatografía líquida de alta definición (HPLC) del sobrenadante del cultivo. La biotransformación de PA a 2HPA también se observa con células en suspensión de *E. coli* W14 (pAAD::Tn1000 #3) incubadas en presencia de PA.

Los estudios realizados mediante la subclonación del fragmento de DNA de 15,4-kb clonado en pAAD mostraron que únicamente se producía 2HPA a partir de PA cuando se expresaban simultáneamente las ORFs *paaK* y *paaABCDE*. Así, *paaK* se clonó bajo el control del promotor *Plac* en el plásmido pAFK5. Las ORFs *paaABCDE* se clonaron también, bajo el control del promotor *Plac* en el vector de bajo número de copias pCK01 generándose el plásmido pAFAF1, el cual es compatible con el plásmido pAFK5. La introducción de los plásmidos pAFK5 y pAFAF1 en *E. coli* W14 permitió la obtención de una bacteria recombinante, *E. coli* W14 (pAFK5, pAFAF1), capaz de producir 2HPA cuando se cultivaba en medio mínimo M63 conteniendo glicerol como fuente de carbono y en presencia de PA. El PA se había transformado en 2HPA que se acumulaba en el sobrenadante del cultivo. La biotransformación de PA a 2HPA también se observa con células en suspensión de *E. coli* W14 (pAFK5, pAFAF1) incubadas en presencia de PA.

Ejemplos de realización de la invención

En los ejemplos que se exponen a continuación se detalla la experimentación necesaria para desarrollar esta patente.

Ejemplo 1

Construcción del plasmido pAAD y crecimiento de las bacterias recombinantes en PA.

El plásmido pFA2 contiene un fragmento de DNA *Bam*HI de 33,3-kb que confiere al mutante *E. coli* W14 la capacidad de crecer en PA como única fuente de carbono y energía (Ferrández, A., Prieto, M.A., García, J.L., y Díaz, E. (1997) *FEBS Lett.* 406, 23-27). Cuando el fragmento *Hind*III/*Pst*I de 15,4-kb y contenido en el fragmento *Bam*HI de 33,3-kb fue clonado en el vector de bajo número de copias pCK01 (Fernández, S., de Lorenzo, V. y Pérez-Martín, J. (1995) *Mol. Microbiol.* 16, 205-213) digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Pst*I, y la mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5 α (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), se obtuvieron transformantes resistentes a 35 (μ g/ml de cloranfenicol (Cm) (el marcador de resistencia de pCK01) los cuales contenían un plásmido de 19-kb que se denominó pAAD. Todas las técnicas de manipulación de

DNA y transferencia génica por transformación empleadas en este y otros ejemplos de esta patente son de uso generalizado en biología molecular y están descritas en textos generales (p. ej., Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las enzimas de restricción y la DNA-ligasa del fago T4 utilizadas para las clonaciones fueron adquiridas comercialmente.

El plásmido pAAD se introdujo mediante transformación en células de *E. coli* W14 (fenotipo PA⁻), seleccionándose uno de los transformantes resistente a cloranfenicol. Para comprobar si *E. coli* W14 (pAAD) era capaz de crecer en PA como única fuente de carbono, se inocularon células de esta cepa a una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,1, en medio mínimo M63 suplementado con vitamina B12 (5 ng/ml), Cm (35 μ g/ml) y PA (adquirido de Sigma) (5 mM). Tras incubación durante 16 h a 30 °C con agitación (300 rpm), el cultivo mostró una DO600 aproximada de 2, indicando que el PA era utilizado por las células como única fuente de carbono y energía. Por lo tanto, estos experimentos demostraban que el plásmido pAAD contiene y expresa los genes responsables del catabolismo de PA en *E. coli* W.

Ejemplo 2

Secuenciación y análisis de un fragmento de DNA de 14.328 pares de bases clonado en el plasmido pAAD.

El inserto de DNA del plásmido pAAD se secuenció utilizando oligonucleótidos sintéticos como cebadores mediante la técnica de terminación de la polimerización por dideoxinucleótidos (Sanger, F.S., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467). Para ello se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante del "Taq DNA polymerase-initiated cycle sequencing kit" (Applied Biosystems Inc.) y las reacciones de secuencia fueron analizadas con un secuenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems Inc.). La secuencia de nucleótidos ha sido depositada en el GenBank/EMBL Data Bank con el número de acceso X97452.

Ejemplo 3

Mutagénesis con el transposón Tn1000 del DNA clonado en pAAD y caracterización del mutante #3.

La obtención de mutantes en el plásmido pAAD se llevó a cabo mediante mutagénesis con el transposón Tn1000 presente en el plásmido F de la cepa *E. coli* MG1063 (Guyer, M.S. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 362-369). La transformación de esta cepa con el plásmido pAAD da lugar a la formación de cointegrados entre los dos plásmidos a través del Tn1000. Estos cointegrados pueden ser transferidos a una cepa receptora mediante las funciones de movilización del plásmido F (Guyer, M.S. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 362-369). Así, se cultivó durante 16 h a 37°C la cepa donadora, *E. coli* MG1063 (pAAD), en medio Luria-Broth (LB) suplementado con Cm (35 μ g/ml), y la cepa receptora, *E. coli* CC118 (Ferrández, A., García, J.L. y Díaz, E. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 2573-2581), en medio LB. Los cultivos fueron diluidos en el mismo

medio sin antibióticos a una DO600 de 0,1 e incubados a 37°C sin agitación hasta alcanzar una DO600 de 0,5, momento en el que se procedió a mezclar 2 ml del cultivo de la cepa donadora con 1 ml del de la cepa receptora, incubándose la mezcla durante 2 h a 37°C sin agitación. Finalmente, la mezcla de cultivos se llevó a un volumen de 12 ml con medio LB, y fue incubada durante 3 h a 37°C con fuerte agitación. Se inocularon distintas diluciones de esta mezcla en placas de LB suplementadas con 50 µg/ml de rifampicina (Rf) (marcador de la cepa receptora) y Cm (35 µg/ml). Una vez en la célula receptora, los cointegrados son resueltos dando lugar a la recuperación del plásmido F y a un derivado del plásmido pAAD que contiene una copia del transposón Tn1000.

De uno de los exconjugantes obtenidos, denominado #3, se extrajo el plásmido pAAD mutante y mediante digestión con enzimas de restricción se localizó la inserción del transposón Tn1000 en la ORF denominada *paaZ*. Cuando el plásmido pAAD::Tn1000 #3 se introdujo mediante transformación en células de *E. coli* W14, la cepa resultante no fue capaz de crecer, según el protocolo que se describe en el Ejemplo 1, utilizando PA como única fuente de carbono. Este resultado indicaba que la interrupción de la ORF *paaZ* impide el catabolismo de PA en *E. coli*.

Ejemplo 4

Biotransformación de PA a 2HPA mediante fermentación de E. coli W14 (pAAD::Tn1000 #3).

Se inoculó la cepa *E. coli* W14 (pAAD::Tn1000#3) a DO600 de 0,1 en medio mínimo M63 suplementado con glicerol 20 mM como fuente de carbono, vitamina B12 (5 ng/ml), Cm (35 µg/ml) y PA (1 mM). Se tomaron alícuotas del cultivo a distintos tiempos de incubación con agitación (300 rpm) a 30°C, se centrifugaron y el sobrenadante libre de células se sometió a un análisis por HPLC según se describe en el Ejemplo 5. El resultado de este análisis reveló que el PA se había transformado en 2HPA al cabo de 24 h de incubación. Por lo tanto, la inactivación de la ORF *paaZ* en el plásmido pAAD::Tn1000#3 provoca la transformación específica de PA a su derivado hidroxilado 2HPA, el cual se secreta fuera de la célula y se acumula en el medio de cultivo.

Ejemplo 5

Detección e identificación de 2HPA.

Para la detección de 2HPA en las diferentes muestras de los ejemplos 4, 6 y 8, 20 µl de cada una de ellas se analizó por HPLC empleando un equipo Gilson equipado con una columna Li-chrosphere 5 RP-8 (150 x 46 mm). Como eluyente se empleó metanol-H₂O 40% conteniendo ácido trifluoroacético 1:1000, a un flujo de 1 ml/min. Dos picos con tiempos de retención 5,60 y 10,67 minutos, correspondientes a los compuestos patrón 2HPA (adquirido de Sigma) y PA, respectivamente, fueron detectados espectrofotométricamente a 210 nm.

Para confirmar la identidad del 2HPA presente en las muestras analizadas, se realizaron análisis por espectroscopía de masas empleando un espectrofotómetro Q-Mass (Perkin-Elmer) acoplado a un cromatógrafo de gases Autosystem (Perkin-Elmer). La muestra fue preparada por extracción de los correspondien-

tes sobrenadantes, llevados a pH 3 con HCl, con un volumen de acetato de etilo. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y fue evaporada bajo una corriente de N₂. El residuo obtenido fue disuelto en 50 µl de piridina (Fluka) suplementada con 3-etilvanilina (4 mg/ml) como patrón interno, y 12,5 µl de esta solución fueron tratados durante 30 minutos a 80°C con 20 µl de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) como agente derivatizante. La muestra así preparada fue inmediatamente analizada, revelando la existencia de 2HPA.

Ejemplo 6

Biotransformación de PA a 2HPA con células en suspensión de E. coli W14 (pAAD::Tn1000#3).

Se inocula la cepa *E. coli* W14 (pAAD::Tn1000#3) a DO600 de 0,1, en medio mínimo M63 suplementado con glicerol 20 mM como fuente de carbono, vitamina B12 (5 ng/ml), Cm (35 µg/ml) y PA (1 mM). Tras incubación a 30°C con agitación (300 rpm) hasta alcanzar una DO600 de 1,0, el cultivo se centrifugó y las células se lavaron con un volumen de medio M63. El sedimento celular se resuspendió en 1/10 de volumen de medio M63 conteniendo PA (1 mM). La suspensión celular (5 ml) se incubó a 30°C con agitación y se tomaron muestras (0,5 ml) a distintos tiempos. Las muestras se centrifugaron 5 min en una microcentrifuga (12.000 rpm) y el sobrenadante libre de células se sometió a los análisis descritos en el Ejemplo 5. Se observó que al cabo de 24 h de incubación el PA se había transformado en 2HPA.

Ejemplo 7

Construcción de los plásmidos pAFK5 y pAFAF1.

Para la construcción del plásmido pAFK5, el fragmento de DNA *SphI/BamHI* de 4,9-kb y que se encuentra contenido en el plásmido pAAD, se clonó en el vector pUC19 (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) digerido con las enzimas de restricción *SphI* y *BamHI*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α seleccionándose los transformantes resistentes a 100 µg/ml de ampicilina (Ap). El análisis de plásmido en los transformantes reveló la presencia de pAFK4, un plásmido que contiene las ORFs *paaK* y *paaXY*. Para expresar únicamente *paaK*, el plásmido pAFK4 se digirió con las enzimas de restricción *BsrGI* y *SmaI*, posteriormente se rellenó el extremo cohesivo generado por *BsrGI* con la ayuda del fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I de *E. coli* (Pharmacia), y el plásmido se religó con la DNA-ligasa del fago T4 (Amersham). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α y los transformantes Ap resistentes mostraron un plásmido, pAFK5, que contiene la ORF *paaK* bajo el control del promotor *Plac* en un replicón de alto número de copias.

Para la construcción del plásmido pAFAF1, el fragmento de DNA *BglII* de 5,4-kb proveniente de pAAD::Tn1000#10, se ligó al plásmido de bajo número de copias pCK01 (Fernández, S., de Lorenzo, V. y Pérez-Martín, J. (1995) Mol. Microbiol. 16, 205-213) digerido con la enzima de restricción *BamHI*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α y de los transformantes

resistentes a Cm (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se aisló un plásmido, pAFAF1, que contenía las ORFs *paaABCDE* bajo el control del promotor Plac y en un replicón compatible con el del plásmido pAFK5.

Ejemplo 8

Biotransformación de PA a 2HPA mediante fermentación de E. coli W14 (pAFK5, pAFAF1).

Se inoculó la cepa de *E. coli* W14 conteniendo los plásmidos compatibles pAFAF1 y pAFK5 a una DO600 de 0,1, en medio mínimo M63 suplementado con glicerol 20 mM como fuente de carbono, vitamina B12 (5 ng/ml), Cm (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Ap (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y PA (1 mM). Se tomaron

alícuotas del cultivo a distintos tiempos de incubación con agitación (300 rpm) a 30°C, se centrifugaron y el sobrenadante libre de células se sometió a un análisis por HPLC según se describe en el Ejemplo 5. El resultado de este análisis reveló que el PA se había transformado en 2HPA al cabo de 24 h de incubación. Por lo tanto, la expresión simultánea de las ORFs contenidas en pAFK5 y pAFAF1 provoca la transformación específica de PA a su derivado hidroxilado 2HPA, el cual se secreta y se acumula en el medio de cultivo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir 2 - hidroxifenilacetato (2HPA) utilizando las secuencias de nucleótidos involucradas en el catabolismo del fenilacetato (PA) en *Escherichia coli* W, **caracterizado** por las siguientes operaciones:

a) aislar en el plásmido pAAD el DNA involucrado en el catabolismo de PA en *E. coli* W;

b) identificar en la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado en el plásmido pAAD los marcos de lectura abiertos (ORFs) que contienen la información necesaria para que se lleve a cabo el catabolismo del PA;

c) construir mediante mutagénesis con el transposón Tn1000 un plásmido pAAD mutante, pAAD::Tn1000#3, que contiene interrumpida por el transposón la ORF denominada *paaZ* según la secuencia depositada con el número de acceso X97452 y, por lo tanto, no funcional;

d) construir, mediante la subclonación del inserto de DNA del plásmido pAAD, los plásmidos pAFK5, expresa la ORF *paaK*, y pAFAF1, expresa las ORFs *paaABCDE* según la secuencia depositada con el número de acceso X97452;

e) transformar las células hospedantes *E. coli* W14 con el plásmido pAAD::Tn1000#3, o con los plásmidos compatibles pAFK5 y pAFAF1;

f) cultivar las células recombinantes en un medio de cultivo adecuado que permita la producción de las proteínas codificadas en los plásmidos cuya construcción se describe en los apartados 1c y 1d.

g) utilizar las células cuyo crecimiento se describe en el apartado 1f, o productos derivados de

éstas, para la transformación de PA en 2HPA.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las células hospedantes transformadas consisten en las cepas puras de *E. coli* CECT 5056 *E. coli* W14 (pAFAF1, pAFK5) y CECT 5057 *E. coli* W14 (pAAD:Tn1000#3), sus mutantes o sus derivados transformados.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 por el que se pueda producir 2HPA utilizando la información contenida en la secuencia nucleotídica cuyo número de acceso es X97452, o en secuencias homólogas.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que los plásmidos utilizados contengan, total o parcialmente, la secuencia de nucleótidos depositada con el número de acceso X97452 o secuencias homólogas, así como mutaciones (por ej. inserciones con transposones) en dichas secuencias.

5. Un procedimiento según la reivindicación 1c en el que la mutación de la ORF denominada *paaZ* pueda hacerse por otros métodos conocidos

6. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que se utilicen otras células hospedantes transformadas con los plásmidos de las reivindicaciones 1 y 4.

7. Un procedimiento según la reivindicación 1 que utilice las proteínas codificadas en pAAD, así como proteínas homólogas.

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7 **caracterizado** porque las células utilizadas para la transformación de PA en 2HPA se encuentran en suspensión ó muertas en forma de extracto celular.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 148 084
② N.º solicitud: 009801503
③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.07.1998
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12P 7/42 // (C12P 7/42, C12R 1:19)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5739017 A (H.R. STAUDENMAIER et al.) 14.04.1998, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

25.08.2000

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1