



No. 11-025903- -00001-0000

Fecha: 2011-03-09 10:53:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 51**FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES**

1

SOLICITUD DE:☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE**Nombre:** SUNTORY HOLDINGS LIMITED

Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón.

Dirección: 1-40, Dojimahama 2-chome,
Kita-ku, Osaka-shi,
Osaka 530-8203,
Japón**Domicilio:** Osaka,
Japón**Teléfono:** 546 09 70 **Fax:** 249 40 70**E-mail:** clientes@cavelier.com**IDENTIFICACION**C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO****Nombre:** Luz Clemencia de PAEZ**Dirección:** Carrera 4ª No. 72-35**Teléfono:** 347 36 11 **Fax:** 217 92 11**E-mail:** cavelier@cavelier.com**IDENTIFICACION**C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente: 11.025.903

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo descriptivo corregido y pido respetuosamente a su Despacho que se tenga en cuenta al momento de realizar el examen de patentabilidad.

6

Comprobante de pago No. 11-0018660**Fecha:** 01 de marzo de 2011

7

Anexos

Comprobante de pago de la tasa por \$118.000, por concepto de modificaciones.



Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.



Poderes, si fuere el caso



Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ **FIRMA:** Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

SCT

Descripción

Transferasa glucuronilo y un polinucleótido que codifica el mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a una transferasa glucuronilo, un poli nucleótido que codifica el mismo, un vector que comprende el mismo, un transformante, etcétera.

Antecedentes del arte

Flavonoides son un término colectivo para los metabolitos secundarios en el camino fenil propanoide. Antocianinas, un tipo de flavonoides, son pigmentos de color mayores los cuales determinan los colores de las flor de especialmente rojo, o anaranjado a morado azulado. Flavona o glucósidos de flavonol, los cuales son un tipo de flavonoides, demuestran ellos mismos un color pálido amarillo pero forma complejos con pigmentos antocianina para crear mayores efectos en el tono de color de las flores y por lo tanto son llamados copigmentos. En general, un cambio del color de la flor hacia el lado de la longitud de onda azul es llamado copigmentación.

Apigenina 7- O- Glucurónido (glucurónidos conjugados, también llamados como glucósidos Glucurónido) es acumulada en los pétalos de boca de dragón *Lamiales*, *Scrophulariaceae*, *Antirrhinum majus*, el cual considerado que funcione como un copigmento (Documento 1: Asen, S. et al., *Phytochemistry* 11, 2739-

2741, 1972). El pigmento de los pétalos azules de *asterales*, *asteraceae*, *centaurea cyanus* forma un complejo metálico y flavona 7- O- glucurónidos los cuales se encuentran en los complejos metálicos (Documento 2: Shiono, M. et al., Nature 436, 791- 792, 2005).

Flavona 7- O- glucurónidos llamados baicalin teniendo una actividad anti-inflamatoria acumulada en la base del *Lamiales*, *Lamiaceae*, *Scutellaria baicalensis*. La base es usada como una hierba china medicinal (owgon) que exhibe efectos estomacales (Documento 3: Gao, Z. et al., Biochemica et Biophysica Acta 1472, 643-650, 1999). SbUBGAT (también llamado como Sb7GAT) es purificado de la base de *Scutellaria baicalensis* como una transferasa la cual transfiere ácido glucurónico a la posición 7- O de baicaleína (Documento 4: Nagashima S. et al., Phytochemistry 53, 533-538, 2000). El gen correspondiente a Sb7GAT ha sido registrado en GenBank (adhesión No. AB042277) pero su función sigue sin ser identificada. En los últimos años, ha sido claro que 7- O- glucurónidos de varias flavonas son acumuladas también en las hojas de *lamiaceae perilla frutescens* que rutinariamente son comidos, y su funcionalidad en la salud humana es esperada (Documento 5: : Yamazaki, M. et al. Phytochemistry 62, 987-998, 2003).

De esta manera, flavona 7-O -glucurónidos son los metabolitos secundarios de plantas las cuales han llamado mucha atención en el campo del color de las flores y alimentación saludable. Sin embargo, sus enzimas bio sintéticas (ej., glucuronosilo transferasa) siguen sin ser adecuadamente conocidos.

[Documentos]

1. Asen, S. et al., *Phytochemistry* 11, 2739-2741, 1972
2. Shiono, M. et al., *Nature* 436, 791-792, 2005
3. Gao, Z. et al., *Biochemica et Biophysica Acta* 1472, 643-650, 1999
4. Nagashima S. et al., *Phytochemistry* 53, 533-538, 2000
5. Yamazaki, M. et al., *Phytochemistry* 62, 987-998, 2003

Demostración de la invención

Bajo estas circunstancias, ha sido deseado identificar una transferasa glucuronosilo novedosa teniendo una especificidad de sustrato más amplia y codificación genética igualmente.

Teniendo en cuenta las siguientes circunstancias la presente invención ha sido hecha y provee los siguientes glucuronosilo transferasa y codificación de poli nucleótidos igualmente, también como vectores comprendidos igualmente, transformantes, y de más.

(1) Un poli nucleótido de cualquiera de (a) a (f) de los siguientes:

(a) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7;

- (b) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de amino ácidos representada por SEQ ID NO: 8;
- (c) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de amino ácidos representada por SEQ ID NO: 8 en la cual los amino ácidos 1 a 15 son borrados, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;
- (d) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de amino ácido teniendo por lo menos 80% de homología a la secuencia de amino ácidos representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;
- (e) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que comprende una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa; y,
- (f) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste de la secuencia de amino ácidos representada

por SEQ ID NO: 8, y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- poli nucleótido.

(2) El poli nucleótido de acuerdo a (1) anteriormente, el cual es cualquiera de (g) a (j) descritos próximamente:

(g) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 en la cual en la mayoría de los 10 amino ácidos son borrados, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;

(h) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína teniendo una secuencia de aminoácido teniendo por lo menos 90% de homología a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa;

(i) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo altas condiciones estrictas con un poli nucleótido que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa; y,

(j) Un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones altamente estrictas con un poli nucleótido que consiste de una

secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 y codifica una proteína teniendo una actividad UDP- glucuronosilo transferasa.

- (3) El poli nucleótido de acuerdo a (1) anteriormente, el cual comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótidos en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7.
- (4) El poli nucleótido de acuerdo a (1) anteriormente, el cual comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8.
- (5) El poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (3) anteriormente, el cual es un ADN.
- (6) Una proteína codificada por el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (5) anteriormente.
- (7) Un vector que comprende el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (5) anteriormente.
- (8) Un transformante transformado con el poli nucleótido de acuerdo a cualquiera de (1) a (5) anteriormente.
- (9) Un transformante transformado con el vector de acuerdo a (7) anteriormente.

- (10) Un método para producir la proteína de (6) anteriormente, el cual comprende el uso del transformante de acuerdo a (8) o (9) anteriormente.
- (11) Un método para producir un glucurónido conjugado, el cual comprende la formación de glucurónido conjugado del ácido glucurónico-UDP y sustrato selector glicosil usando la proteína de acuerdo a (6) anteriormente como un catalizador.

El poli nucleótido de la presente invención es útil, por ejemplo, para la producción de una novedosa glucuronosilo transferasa la cual comprende la introducción de poli nucleótido dentro de un transformante. En una realización preferida de la presente invención, la glucuronosilo transferasa tiene una especificidad de sustrato más amplia y una actividad para la glucuronidación de varios sustratos selectores de glicosil.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 es una fotografía de SDS- PAGE en la cual la proteína expresiva *Escherichia coli* fue confirmada. M: marcador de tamaño, P: fracción de gránulo, C: fracción de enzima en bruto, FT: fracción no- adsorbida, 50: fracción eluida con 50 mM imidazol, 200: fracción eluida con 200 mM imidazol, 500: fracción eluida con 500 mM imidazol, flecha: proteína de objetivo (VpF7GAT) en la cual *Escherichia coli* fue expresada.

FIG. 2 (A) es un diagrama que demuestra los resultados del análisis HPLC de apigenina. FIG. 2 (B) es un diagrama que demuestra los resultados del análisis

HPLC de la solución de reacción de enzimas (apigenina y UDP- ácido glucurónico). FIG. 2 (C) es un diagrama que muestra los resultados del análisis HPLC de apigenina 7- O- glucurónido. FIG. 2 (D) es un diagrama que muestra los resultados de medida de la solución de reacción de enzimas ((apigenina y UDP- ácido glucurónico) por TOF- MS.

FIG. 3 es un dibujo que muestra los resultados de análisis del substrato selector glicosil de VpF7GAT para su especificidad de substrato.

FIG. 4 es un dibujo que muestra el análisis de expresión del gen VpF7GAT en diferentes órganos a través de RT- PCR cuantitativo.

[Lista de secuencia libre de texto]

SEQ ID NO: 1: ADN Sintético

SEQ ID NO: 2: ADN Sintético

SEQ ID NO: 3: ADN Sintético

SEQ ID NO: 4: ADN Sintético

SEQ ID NO: 5: ADN Sintético

SEQ ID NO: 6: ADN Sintético

SEQ ID NO: 9: ADN Sintético

SEQ ID NO: 10: ADN Sintético

SEQ ID NO: 11: ADN Sintético

SEQ ID NO: 12: ADN Sintético

SEQ ID NO: 13: ADN Sintético

SEQ ID NO: 14: ADN Sintético

Mejor forma de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, la transferasa glucuronosilo de la presente invención, el poli nucleótido codificado en el mismo, el vector que comprende el mismo, el transformante y de esa manera será descrita en detalle.

El pigmento antocianina principal de *V. pérsica* que pertenece al género *Veronica* de la familia *Scrophulariaceae* en el orden *Lamiales*, del cual produce una flor azul, es delfinidina o 3- O- (3- O- (6- O- coumaroil) – glucosil)- 6- O- coumaroil-glucósido- 5- O- glucósido y la flavona principal es apigenina 7- O- (3- O- glucuronosilo) – glucurónido (Miho Ruike, Tesis Maestra en la Universidad Toyo, 2003). Esta flavona 7- O- glucurónido teniendo una columna de apigenina demuestra efectos de copigmento marcados en el pigmento antocianina principal, y es por lo tanto considerado ser responsable por el color de la flor de *Veronica pérsica*. La presente invención aisló el gen de flavonoide 7- O- transferasa glucuronosilo (F7GAT) del cADN de los pétalos de *Veronica pérsica* usando PCR y obtuvo el poli nucleótido (SEQ ID NO: 7) el cual es una demostración de la presente invención.

1. Poli nucleótido de la presente invención.

Genotipo, la presente invención provee (a) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que consiste de la secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NOL: 7 (específicamente, un ADN, de aquí en adelante de vez en cuando referido simplemente como "ADN"), y (b) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una

proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8. El ADN marcado en la presente invención no se limita sólo al ADN que codifica la transferasa glucuronosilo descrito previamente pero también incluye otro ADN que codifique una proteína funcionalmente equivalente a esta proteína.

La proteína funcionalmente equivalente es, por ejemplo, (c) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 en la cual 1 a 15 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y que tenga una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Dicha proteína incluye, por ejemplo, una proteína que consiste de una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 donde 1 a 15, 1 a 14, 1 a 13, 1 a 12, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6 (1 muchos) 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 aminoácido (s) es/ son eliminados, substituidos, insertados y o añadidos y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. En general, entre menor sea el número de disminuciones, substituciones, inserciones, y o adiciones, será más preferible.

La proteína funcionalmente equivalente también incluye, por ejemplo, (d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos una homología de 80% a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 y teniendo una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Dicha proteína incluye una proteína que tiene una secuencia de aminoácido que tiene una homología de aproximadamente 80% o mayor, 81% o mayor, 82% o mayor, 83% o mayor, 84% o mayor, 85% o mayor, 86% o mayor, 87% o mayor, 88% o mayor, 89% o mayor, 90% o mayor, 91% o mayor, 92% o mayor, 93% o mayor, 94% o mayor, 95% o

mayor, 96% o mayor, 97% o mayor, 98% o mayor, 99% o mayor, 99.1% o mayor, 99.2% o mayor, 99.3% o mayor, 99.4% o mayor, 99.5% o mayor, 99.6% o o mayor, 99.7% o mayor, 99.8% o mayor, o 99.9% o mayor, a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, y teniendo la actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. En general, entre mayor sea el porcentaje de homología anterior, será más preferible.

Como se usa aquí, el término " actividad de transferasa glucuronosilo- UDP" se refiere a una actividad de catalizar la reacción que comprende la glucuronidación de grupos hidroxilos grupos del selector glicosil substratos como flavonoides, estilbenos, líganos, etc. (glucuronidación de, ej., un flavonoide en su posición 7 OH) para formar conjugados glucurónidos.

La actividad de transferasa glucuronosilo- UDP puede ser evaluada, por ejemplo, al reaccionar el ácido glucurónico con un substrato selector de glicosil (ej. una flavona) presencia de una enzima analito para ser evaluada y analizada el producto de reacción por HPLC, etc. (cf., ejemplos serán descritos con más detalles después).

La presente mención también incluye (e) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 y codifica una proteína que contiene una actividad de

transferasa glucuronosilo- UDP, y (f) un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas con un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8 y codifica una proteína que contiene una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP.

Como se usa aquí, el "poli nucleótido" se usa para significar ADN o ARN, preferiblemente un ADN.

Como se usa aquí, el término "poli nucleótido que se hibrida bajo condiciones estrictas" se refiere a, por ejemplo, un poli nucleótido obtenido por la hibridación en colonia, hibridación de placa, hibridación sureña o sus parecidos, usando como una muestra todo o parte de un poli nucleótido que consiste de secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido en las posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7 o un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de un poli nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. El método de hibridación puede ser un método descrito, por ejemplo, Sambrook & Russell, clonación molecular: un manual de laboratorio Vol. 3, Cold Spring Harbor, prensa de laboratorio 2001, Ausubel, protocolos recientes de biología molecular, John Wiley & Sons 1987-1997, etc.

Como se usan aquí, las "condiciones estrictas" pueden ser cualquiera de las condiciones levemente estrictas, condiciones moderadamente estrictas o condiciones altamente estrictas. Las "condiciones levemente estrictas" son, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamida y 32°C. Las "condiciones moderadamente estrictas" son, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamida y 42°C. Las "condiciones altamente estrictas" son, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamida y 50°C. Bajo estas condiciones, conforme la temperatura es más alta, un ADN con mayor homología se espera ser obtenido eficientemente a mayores temperaturas, sin embargo múltiples factores se envuelven en el nivel de exigencia de hibridación incluyendo la temperatura, concentración de muestra, longitud de muestra, fuerza iónica, tiempo, concentración de sal y sus parecidos. Una persona conocedora del arte puede lograr exigencia similar al elegir estos factores de una manera apropiada.

Cuando un equipo disponible comercialmente para la hibridación, por ejemplo, Alkphos Direct Labeling Reagents (producido por Amersham Pharmacia) puede ser usado. En este caso, de acuerdo al protocolo añadido, una membrana es incubada con una muestra marcada por toda la noche, la membrana es lavada con un buffer de lavado primario que contiene 0.1% (w/v) SDS a 55°C y el ADN hibridado puede ser detectado.

Adicionalmente a aquellos escritos debajo, otros poli nucleótidos que pueden ser hibridados incluyen ADNs que tengan una homología de aproximadamente 60% o

mayor, aproximadamente 70% o mayor, 71% mayor, 72% mayor, 73% mayor, 74% o mayor, 75% o mayor, 76% o mayor, 77% o mayor, 78% o mayor, 79% o mayor, 80% o mayor, 81% o mayor, 82% o mayor, 83% o mayor, 84% o mayor, 85% o mayor, 86% o mayor, 87% o mayor, 88% o mayor, 89% o mayor, 90% o mayor, 91% o mayor, 92% o mayor, 93% o mayor, 94% o mayor, 95% o mayor, 96% o mayor, 97% o mayor, 98% o mayor, 99% o mayor, 99.1% o mayor, 99.2% o mayor, 99.3% o mayor, 99.4% o mayor, 99.5% o mayor, 99.6% o mayor, 99.7% o mayor, 99.8% o mayor o 99.9% o mayor, a un ADN que codifica un ADN de la secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7, o un ADN que codifique la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, como se calcula a través de un programa de búsqueda de homología, como es FASTA y BLAST usando parámetros predeterminados.

La homología entre secuencia de aminoácidos o secuencias de nucleótidos puede ser determinado usando el algoritmo BLAST por Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873, 1993). Programas llamados BLASTN y BLASTX basados en el algoritmo BLAST han sido creados (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Cuando una secuencia de nucleótido es secuenciada usando BLASTN, los parámetros son, por ejemplo, puntaje = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando la secuencia de aminoácido es secuenciada usando BLASTX, los parámetros son, por ejemplo, puntaje de longitud de palabra = 3. Cuando los programas BLAST y BLAST intercalado son

usados, parámetros predeterminados para cada uno de los programas son empleados.

El poli nucleótido de la presente invención descrita previamente puede ser adquirido a través de conocidas técnicas de ingeniería genética o conocidas técnicas sintéticas.

2. Proteína de la invención

En una siguiente demostración, la presente invención también provee una proteína codificada por el poli nucleótido de la presente invención descrita previamente. En una demostración de la presente invención, la proteína de la presente invención es una proteína que consiste de una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. En una siguiente demostración de la presente invención, la proteína es una proteína que contiene la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. En una demostración aún más lejana de la presente invención, la proteína es una proteína que consiste en la secuencia de aminoácido representada por la secuencia SEQ ID NO: 8 en la cual 1 a 15 aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos y tienen una actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Dicha proteína incluye una proteína que tiene la secuencia de aminoácido que tiene la homología descrita anteriormente a la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8. Y teniendo la actividad de transferasa glucuronosilo- UDP. Estas proteínas pueden ser obtenidas usando mutagénesis dirigida al sitio de escrita en Sambrook &

Russell, relación molecular: un manual de laboratorio, Vol. 3, Cold Spring Harbor, Prensa de laboratorio 2001, Ausbel, protocolos recientes en la biología molecular, John Wiley & Sons 1987-1997, Nuc. Acids Res., 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nuc. Acids Res., 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), etc.

En la secuencia de aminoácido para la proteína de la presente invención, la substracción, substitución, inserción, y o adición de uno o más (ej., 1 a 15, preferiblemente 10 o menos) residuos de aminoácido significa que una o una cantidad de residuos de aminoácidos son removidos, substituidos, insertados y o añadidos a una cantidad de posiciones en la misma secuencia de aminoácido. Dos o más tipos de reducciones, substitución es, inserciones, y adiciones pueden ocurrir al mismo tiempo.

Ejemplos de residuos de aminoácido los cuales son sustituibles mutuamente son dados próximamente. Residuos de aminoácido en el mismo grupo son mutuamente sustituibles.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, o-metilo serina, t-butilo glicina, t-butilo alanina y ciclo hexilo alanina; Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, iso ácido aspártico, isoácido glutámico, 2-ácido amino adípico y 2-ácido amino subérico; Grupo C: asparagina y glutamina; Grupo D: lisina, arginina, ornitina, 2,4-ácido di amino butanoico y 2,3-ácido di amino propiónico; Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina and 4-

hidroxiprolina; Grupo F: serina, treonina y homoserina; y Grupo G: fenilalanina y tyrosine.

Las proteínas de la presente invención también pueden ser producidas por métodos de síntesis química como el método Fmoc (método fluorenilo metilo oxi carbonilo) y el método tBoc (método t- butilo oxi carbonilo). Adicionalmente, sintetizadores péptidos disponibles de Advanced ChemTech, Perkin Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instruments, SyntheCélula- Vega, PerSeptive, Shimadzu Corp., etc. también pueden ser usados para la síntesis.

Incluida aquí, la proteína de la presente invención es una transferasa glucuronosilo. El término "transferasa glucuronosilo" cataliza la reacción de la transferencia de residuos de ácido glucurónico de un donante glicosil a un sustrato selector glicosil para formar el conjugado glucurónido. En la presente invención, el sustrato selector glicosil es, por ejemplo, un flavonoide, un estilbeno, un coumarin y un lignano. El donante glicosil es, ej., ácido glucurónico-UDP. En una demostración de la presente invención, la proteína cataliza la reacción de la transferencia de residuos de ácido glucurónico desde ácido glucurónico-UDP a sustrato selector glicosil para formar el conjugado glucurónido y UDP.

Los flavonoides los cuales son sustratos selectores glicosil incluyen flavonas, flavonol, flavanonas, isoflavonas, C-heterósidos, auronas, catequinas, y sus parecidos. Entre ellos, ejemplos de flavonas incluyen baicaleína, escutelareína,

apigenína, luteolina, triacetina, diosmetina y chrysoeriol. Ejemplos de flavonol incluyen quercetina, miricetina y kaempferol. Un ejemplo de flavona es naringenina. Ejemplos de isoflavonas son genisteína, daidzeína y formononetina. Ejemplos de C- heterósidos de flavona incluyen vitexina, isovitexina y orientina. Un ejemplo de aurones es aureusidina. Ejemplos de catechinas son catechin y epigallocatechin gallate.

El estilbeno incluye resveratrol y su glicosido piceid, etc.

El lignano incluye (+)-pinoresinol, (+)-piperitol, (+)-sesaminol, (+)-secoisolariciresinol, (+)-sesamin catechol 1 (SC1), (+)-sesamin catechol 2 (SC2), (+)-episesamin catechol 2 (EC2), matairesinol, etc.

En una demostración de la presente invención, en substrato Selector glicosil es un flavonoide. En otra demostración de la presente invención, el substrato selector glicosil es una flavona con un grupo y hidroxil en la posición 4' del aro B. en una demostración aun más lejana de la presente invención, el substrato selector glicosil es por lo menos un substrato selector glicosil elegidos de un grupo que consiste de escutelareína, apigenína, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, kaempferol y naringenina.

Por ejemplo, la transferasa glucuronosilo (VpF7GAT) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 de muestra una actividad con el substrato selector glicosil es una flavona como por ejemplo escutelareína, baicaleína, apigenína, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, etc., flavonol como por

ejemplo quercetina, kaempferol, etc. Y flavanonas como por ejemplo naringenina, etc. Especialmente cuando el substrato es escutelareína, apigenína, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, kaempferol and naringenina, la actividad es tan fuerte como cuando se compara a otros substratos selectores glicosil.

3. vector y transformante conteniendo los mismos.

En otra demostración, la presente invención provee un vector de expresión que comprende el poli nucleótido de la presente invención. El vector de la presente invención comprende un poli nucleótido de la presente invención (ej., cualquiera de los poli nucleótidos (a) a (j) descritos previamente). Preferiblemente, el vector de expresión de la presente invención comprende cualquiera de los poli nucleótidos (g) a (j) descritos previamente. Aún más preferiblemente, el vector de expresión comprende un poli nucleótido que consiste de una secuencia de nucleótido en posiciones 1 a 1362 en la secuencia de nucleótido representada por SEQ ID NO: 7, o un poli nucleótido que comprende un poli nucleótido que codifica una proteína que consiste de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

El vector de la presente invención es construido generalmente para contener un casete de expresión que comprende (i) un promotor que puede ser transcrito en una hospedadora Célula, (ii) el poli nucleótido de la presente invención conectado al promotor previamente discutido (ej., cualquiera de los poli nucleótidos en (a) a (j) descritos previamente), y (iii) una señal que funciona en la hospedadora Célula

con respecto a la finalización de la transcripción y la poliadenilación de la molécula de RNA. El vector por lo tanto construido es introducido dentro de una hospedadora Célula. Para construir el vector de expresión, métodos usando un plásmido, fago o cósmido son usados pero no son limitados particularmente.

Específicos tipos de vector es que no son particularmente limitados, y vectores capaces de ser expresados en una hospedadora Célula pueden ser elegidos adecuadamente. Esto es, una secuencia promotora adecuada puede ser elegida dependiendo en el tipo de hospedadora Célula para expresar de una manera confiable el poli nucleótido de la presente invención, y un vector obtenido al incorporar esta secuencia y el poli nucleótido de la presente invención dentro de varios plásmido o de sus parecidos los cuales pueden ser usados como vectores de expresión.

El vector de expresión de la presente invención contiene una región de control de expresión (por ejemplo, un promotor, un terminado, y o un origen de replicación, etc.) dependiendo en qué tipo de hospedadora será introducida. Un promotor convencional (por ejemplo, promotor trc, promotor tac, promotor lac, etc.) es usado como un promotor para un vector de expresión bacteriano. Como un promotor para levadura, han sido usados, por ejemplo, un promotor gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, promotor PH05, etc. como un promotor para hongos se han usado, por ejemplo, amylase, trpC, etc. adicionalmente, un promotor viral (ej., antiguo promotor SV 40, nuevo promotor SV 40, etc.) es usado como promotor de células hospedadora provenientes de animales.

El vector de expresión preferiblemente contiene al menos el marcador selectivo. El marcador disponible incluye un marcador auxotrófico (ura 5, nia D), un marcador resistente a drogas (higromicina, zeocin), un marcador resistente al genético (G418r), un gen resistente al cobre (CUP1) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337, 1984), un gen resistente a cerulenina (fas 2m, PDR4) (Junji Inokoshi et al., Bioquímica, 64, 660, 1992; y Hussain et al., Gene, 101: 149, 1991, respectivamente), y sus parecidos.

La presente invención provee un transformante en el cual el poli nucleótido de la presente invención (por ejemplo, el poli nucleótido descrito en cualquiera de (a) a (j) anteriormente) sea introducido.

Un método para preparar (método de producción) el transformante no es particularmente limitado e incluye, por ejemplo, un método que comprende la introducción del recombinante vector dentro del hospedadora seguido por la transformación. La célula hospedadora usada aquí no está particularmente limitada y varios tipos conocidos de células pueden ser usados preferiblemente. Ejemplos específicos son bacterias como *Escherichia coli*, etc., levadura (incipiente levadura *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*), nematodo (*Caenorhabditis elegans*), ovocitos de rana con garras (*Xenopus laevis*), etc. medios de cultura y condiciones adecuadas para las células hospedadora anteriores son bien conocidas en el arte. Los organismos que serán transformados no son limitados particularmente, e incluyen

varios microorganismos, plantas y animales grados como ejemplos de las células hospedadora anteriores.

Para la transformación de las células hospedadora, se pueden usar métodos generalmente conocidos. Por ejemplo, métodos que pueden ser usados incluyen pero no están limitados al método de electro portación (Mackenzie D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4661, 2000), método de envío de partículas (método descrito en JPA 2005-287403 "Method of Breeding Lipid-Producing Fungus" (método de crecimiento de hongos productores de lípidos)), el método esfero plasto (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978)), el método de acetato de litio (J. Bacteriology, 153: 163 (1983)), y métodos descritos en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978), Methods in levadura genetics, 2000 Edición: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, etc.

En otra demostración de la presente invención, el transformante puede ser un transformante de planta. La planta transformante de acuerdo a la presente invención puede ser adquirida al introducir el vector recombinante que carga el poli nucleótido de la presente invención dentro de la planta de dicha forma que el poli péptido codificado por dicho poli nucleótido pueda ser expresado.

Donde un vector de expresión de recombinante es usado, el vector de expresión recombinante usado para transformar a la planta no está limitado particularmente mientras que el vector sea capaz de expresar el poli nucleótido de la presente invención en dicha planta. Ejemplos de dichos vectores incluyen

un promotor que contienen vector capaz de expresar constitutivamente el poli nucleótido en las células de las plantas (ej., un promotor 35S del virus mosaico coliflor), y un vector activado induciblemente por estimulación externa.

Plantas las cuales serán el objetivo de la transformación de la presente invención puede ser cualquiera de los cuerpos de planta completos, órganos de la planta (ej., hojas, pétalos, ramas, raíces, semillas, etc.), tejidos de la planta (ej., epidermis, líber, parénquima, xilema, haces vasculares, tejidos empalizados, tejido esponjoso, etc.) o culturas de células de planta, o varios tipos de células de plantas (ej., células de cultura en suspensión), protoplastos, rodajas de hoja, callos, y sus parecidos. Ejemplos específicos de especies de planta los cuales son usados para la transformación incluyen, pero no están limitados, aquellos que pertenecen a los *Monocotyledoneae* o a los *Dicotyledoneae*.

Para la transformación de genes dentro de las plantas, métodos de transformación convencionales conocidos aquel conocedor del arte (ej., el método *Agrobacterium*, pistola de genes, el método PEG, el método electroporación, etc.) son usados. Por ejemplo, el método mediado- *Agrobacterium* y el método de introducción directa dentro de las células de la planta son bien conocidos. Cuando el método es *Agrobacterium* usado, el vector de expresión de planta construido es introducido dentro de una rama apropiada de *Agrobacterium* (ej., *Agrobacterium tumefaciens*), seguido por la infección de un disco aséptico de cultura de hojas con esta rama de acuerdo al método de discos de hojas (Hirobumi Uchimiya, manuales para la manipulación de genes de plantas (1990), 27-31, Kodansha

Scientific Co., Ltd., Tokyo). Por lo tanto, la planta transgénica puede ser obtenida. Adicionalmente, el método de Nagel, et al. (Microbiol Lett., 67:325 (1990)) puede ser usado. Éste método envuelve genotipo la introducción, ej., un vector de expresión dentro de *Agrobacterium* y después la introducción del *Agrobacterium* transformado dentro de las células de las plantas o tejidos de plantas de acuerdo al método descrito en Plant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin, et. al., Academic Press Publishers). Aquí, el "tejido de plantas" incluye callos, el cual es obtenido al culturizar células de plantas. Cuando la transformación se lleva a cabo usando el método *Agrobacterium*, vectores binarios (p BI 121, p PZP 202, etc.) pueden ser usados.

Para una transferencia directa de genes dentro de las células de la planta con los tejidos de la planta, el método de electroporación y el método de la pistola de genes son conocidos. Cuando la pistola de genes es usada, el cuerpo de la planta entero, órganos de la planta o tejidos de la planta de esta manera pueden ser usados, como pueden ser usados después de la preparación de las secciones, o puede ser usado después de la preparación de protoplastos. Las muestras de esta manera preparadas pueden ser bombardeadas usando un aparato de transferencia de genes (ej., PDS-1000 (BIO-RAD, Inc.), etc.). Condiciones de bomba ardimiento varían dependiendo del tipo de planta muestra. Normalmente, la muestra es bombardeada bajo presión de aproximadamente 450 a 2000 psi a una distancia de aproximadamente 4 a 12 cm.

Las células o tejidos de la planta en los cuales el gen es introducido son genotípicamente seleccionados por la resistencia química como una resistencia a higromicina, etc. y después regenerados dentro del cuerpo de la planta de una manera convencional. La regeneración del cuerpo de la planta de las células transformante puede ser llevada a cabo por métodos conocidos aquel conocedor del arte, dependiendo del tipo de célula de la planta.

Cuando la cultura de células de la planta es usada como una hospedadora, la transformación se lleva a cabo introduciendo el vector recombinante dentro de la célula de cultura por medio de una pistola de genes, el método electroporación, etc. Callos, brotes, raíces peludas por sus parecidos resultantes de la transformación pueden ser usadas como una cultura de células, cultura de tejidos o cultura de órganos como sean. Alternativamente, estos tejidos o células pueden ser permitidos para ser generados dentro de una planta a través de cualquier método convencional conocido para sacar culturas de tejidos de planta al administrar una hormona de planta (auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico, etileno, brasinolida, etc.).

Si el gen es o no es introducido dentro de la planta puede ser confirmado a través de PCR, la hibridación sureña, la invivable acción norteña, o sus parecidos. Por ejemplo, ADN es preparado de las plantas transformadas, genotipos específicos a ADN después son diseñados, y PCR es empleado subsecuentemente. PCR puede ser empleado bajo las mismas condiciones como se usa para preparar los plásmidos descritos anteriormente. Después, la

transformación puede ser confirmada al aplicar el producto amplificado para electroforesis de gel agarosa , electroforesis de gel poliacrilamida, electroforesis capilar o sus parecidos, el producto con un colorante apropiado, como etidio bromuro, SYBR verde, etc. y después detectar el producto amplificado como una banda simple. Adicionalmente, productos amplificados también pueden ser detectados al emplear PCR usando genotipos marcados con una marca adecuada, ej., colorante fluorescente. Aún más, otros métodos que pueden ser empleados aquí envuelven la combinación del producto amplificado a una fase sólida, como un micro lámina, y después confirmando el producto amplificado a través de fluorescencia, una reacción de encima o sus parecidos. Una vez que la planta transformada donde el poli nucleótido de la presente invención es introducido dentro del genoma se ha obtenido, es posible adquirir descendientes del cuerpo de esa planta a través de reproducción sexual o asexual. Alternativamente, las plantas pueden ser producidas en masa por materiales de crecimiento (por ejemplo, semillas, frutas, orejas, tubérculos, tubos, callos, protoplastos, etc.) obtenidos de la planta, también como descendientes o clones de ella. Cuerpos de la planta transformados capaces de expresar el poli nucleótido de la presente, descendientes del cuerpo de la planta los cuales tienen las mismas calidades cuerpo de la planta, también como tejidos obtenidos de los cuerpos de la planta o de los descendientes, son todos incluidos en la presente invención.

Adicionalmente, métodos para la transformación de varias plantas que ya han sido reportados. Ejemplos de la planta transformante de acuerdo a la presente

invención incluye pero no están limitados, ajonjolí, planta de arroz, tabaco, salvado, trigo, colza, Papa, tomate, chopo, banano, eucalipto, papá dulce, soya, alfalfa, altramuz, maíz, coliflor, Rosa, crisantemo, carburación, boca de dragón, ciclamen, orquídea, lisianthus, Fresia, gerbera, gladiolos, amoles, kalanchoe, lila, pelargonio, geranio, petunia, torenia, tulipán, Forsitia, Arabidopsis, loto, etc.

En una demostración de la presente invención, la planta transformada es una planta para materiales alimenticios funcionales.

En otra demostración de la presente invención, la planta transformada es una planta con un color de flor modificado. Preferiblemente, la planta con el color de flor modificado es una planta con su color de la flor siendo modificada a un color azul.

4. Método de producción de la proteína de la invención

En otra demostración, la presente invención provee un método para producir la proteína de la presente invención usando los transformante es descritos previamente.

Específicamente, la proteína de la presente invención puede ser obtenida al aislar y purificar la proteína de la presente invención de la cultura de los transformantes es descrito previamente. Como se usa aquí, la cultura se refiere a cualquiera de los líquidos de cultura, bacteria culturalizada o células culturalizadas, y el conjunto de bacteria culturalizada o células culturalizadas. Métodos convencionales pueden ser usados para aislar y purificar la proteína de la

presente invención. Específicamente, cuando la proteína de la presente invención es acumulada dentro de la cultura de bacterias o de la cultura de células, un extracto en bruto de la proteína de la presente invención puede ser obtenida al culturalizar la bacteria o células, después interrumpiendo la bacteria o células usando una técnica convencional (ej., ultrasonidos, lisosomas, congelamiento y descongelamiento, etc.) y aplicando un método convencional como filtración o centrifugación. Cuando la proteína en la presente invención es acumulada en el líquido de la cultura, el sobrenadante de la cultura que contiene la proteína de la presente invención puede ser obtenido, después del cumplimiento de la incubación, a través de separación de las bacterias o las células de la sobrenadante de la cultura en una manera convencional (ej., centrifugación, filtración, etc.).

Purificación de la proteína de la presente invención contenida en el extracto o en el sobrenadante de la cultura obtenido como se describió previamente puede ser empleada por un método convencional de separación y purificación. Los métodos de separación y purificación incluyen precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía del líquido de alto rendimiento en fase reversa, diálisis, y ultrafiltración, pueden ser usados uno por uno o en una combinación adecuada.

5. Método para la producción de conjugados glucurónidos

La presente invención además provee un método para la producción de conjugados glucurónidos usando la proteína de la presente invención. La proteína en la presente invención cataliza la reacción transferencia del ácido glucurónico es el donante glicosil (ej., ácido glucurónico- UDP) al substrato selector glicosil (ej., un flavonoide, un estilbeno o un lignano). Por lo tanto, conjugados glucurónico puede ser producido desde el substrato selector glicosil y el donante glicosil como los materiales principales al usar la proteína la presente invención. El substrato selector glicosil preferiblemente es un flavonoide.

El glucurónidos puede ser reproducido, por ejemplo, al preparar una solución que contiene 1mM de substrato selector glicosil, 2mM de donante glicosil, 50mM de buffer de fosfato de calcio (pH 7.5) y 20 uM de la proteína de la presente invención y reaccionar los a 30° C por 30 minutos. El conjugados glucurónidos puede ser aislado purificado de la solución por métodos conocidos. Específicamente, ej., precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía reversa del líquido de alto rendimiento, ultrafiltración, diálisis, etcétera. Pueden ser usados uno por uno o en una combinación apropiada.

El conjugados glucurónidos así obtenido es útil como un re agente para materiales alimenticios funcionales, para inspeccionar sus funciones en vivo, o como un

antioxidante, etcétera. (Gao, Z., Huang, K., Yang, X., and Xu, H. (1999) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472, 643-650).

Ejemplos

La presente invención es descrita en más detalle con referencia a los ejemplos de bajo pero no está dispuesta a ser limitada a ellos.

Ejemplo 1

Clonación genética

Los procedimientos biológicos moleculares usados en este ejemplo cueros llevados a cabo de acuerdo con los métodos descritos en clonación molecular (Sambrook et al., Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001), a menos de que se indique en otro lado en detalle.

Se encontró por búsqueda de homología usando el análisis BLAST que el gen de transferasa glucosil (AmUGTcg10, Accesión No. AB362988) para *Scrophulariaceae Antirrhinum majus* tuvo 55% de homología en el nivel secuencial del aminoácido al gen de transferasa glucosil SbUBGAT (Nagashima S. et al., *Phytochemistry* 53, 533-538, 2000) para *Lamiaceae Scutellaria baicalensis* (Ono, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11075-11080, 2006).

Para aislar la codificación del gen del flavonoide de 7- O- transferasa glucuronosilo VpF7GAT of *Veronica persica* del mismo género *Scrophulariaceae*,

los dos genotipos (SEQ ID NOS: 1 and 2) demostrados próximamente fueron diseñados basados en la secuencia de *Antirrhinum majus* en la misma familia.

SEQ ID NO: 1

AmF7GAT-F1: 5'-GTG ATA GAT TTC TTT TGC AAT-3'

SEQ ID NO: 2

AmF7GAT-R3: 5'-ACC CTA TTC ATC CTC TGC TCC-3'

Después de que todo el ARN fue extraído de los pétalos de *Veronica pérsica* usando el mini equipo de plantas RNeasy (QUIAGEN), cADN fue sintetizado desde RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo al protocolo recomendado por el productor. Usando el cADN como un plantilla, PCR fue llevado a cabo usando genotipos de SEQ ID NOS: 1 y 2 descritos previamente para tratar de aislar el gen codificando VpF7GAT.

Específicamente, la solución de reacción PCR (50 ul) fue compuesta de 1 ul de cADN de *Veronica pérsica*, 1 x buffer ExTaq(Takara- Bio), 0.2 mM dNTPs, 0.4 pmol cada /□I de los genotipos (SEQ ID NOS: 1 y 2) y 2.5 U ExTaq polimerasa PCR fue realizado por la reacción a 94°C por 3 minutos y después amplificando por 35 ciclos con cada ciclo a 94° C. Por 1 minuto, 50° C. por 1 minuto y 72° C. por 2 minutos.

La solución PCR fue separada por 0.8% electroforesis de gel agarosa del fragmento de amplificación correspondiente a un tamaño de aproximadamente 1.0 kb. El fragmento amplificado fue insertado dentro del sitio de multi clonación del vector pCR- TOPOII (Invitrogen). La secuencia de nucleótido del fragmento

insertado fue secuenciado por el método de para el genotipo caminante usando para el genotipo polígono creado sintético con un modelo de secuencia de ADN 3100 (bio sistemas aplicados). La secuencia de nucleótido determinada fue analizada usando el programa CLUSTAL- W (MACVECTOR 7. 2. 2 Software, Accerly) y como resultado, demostró una homología de secuencia alta a *Antirrhinum majus* AmUGTcg10 y *Scutellaria baicalensis* SbUBGAT. Este cADN fue por lo tanto identificado como un gen candidato para VpF7GAT.

Sin embargo, la línea acción de los resultados con AmUGTcg 10 demuestra el fragmento amplificado de c ADN obtenido fue un ORF incompleto (cuadro de lectura abierto) borrado de las regiones 5' y 3'. Por consiguiente, la amplificación rápida del extremo c ADN (aquí abreviado como RACE) fue empleado usando el equipo corredor de genes (Invitrogen) de acuerdo a los métodos recomendados por el productor para amplificar las regiones 5' y 3' del fragmento de cADN. Para RACE, se usaron un equipo de genotipos específicos para el gen VpF7GAT, los son mostrados por SEQ ID NOS: 3 a 6 debajo.

SEQ ID NO: 3

GR-VpF7GAT-RV: 5'-TTC CAG GAG GGT TTC GAA CGG ACC ATA-3'

SEQ ID NO: 4

GR-VpF7GAT-nest-RV: 5'-CTA GAG GTG CAA CGA ATA AAA CTT-3'

SEQ ID NO: 5

GR-VpF7GAT-Fw: 5'-TAT GGT CCG TTC GAA ACC CTC CTG GAA-3'

SEQ ID NO: 6

GR-VpF7GAT-nest-Fw: 5'-AGG ATC CTG ACC TGG AAA CA-3'

La secuencia de nucleótido del fragmento amplificado tenía por RACE fue determinada por el método caminante de genotipo para dar un gen candidato para VpF7GAT que contiene el largo completo ORF y su secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7 (cDNA secuencia de VpF7GAT), SEQ ID NO: 8 (amino ácido secuencia de VpF7GAT)).

Este gen candidato VpF7GAT demostró 61% y 51% de homología de secuencia, respectivamente, a *Antirrhinum majus* AmUGTcg10 y *Scutellaria baicalensis* SbUBGAT, en el nivel de secuencia de aminoácido.

Ejemplo 2

Construcción del vector

Para clarificar las funciones biológicas de la proteína candidata VpF7GAT para el obtenido en el ejemplo 1 (de aquí en adelante esta enzima), un vector de expresión de *Escherichia coli* capaz de expresar cADN para esta enzima fue construido. cADN conteniendo la longitud completa ORF fue amplificado por PCR usando un equipo de genotipos representados por SEQ ID NOS: 9 y 10, en específico para el gen candidato para VpF7GAT. Como el plantilla fue usado, cADNs sintetizado usando el ARN total extraído de los pétalos de *Veronica persica* descrita previamente.

SEQ ID NO: 9

CACC-NdeI-VpF7GAT-Fw: 5'-CAC CCA TAT GGA AGA CAC AAT CAT CCT-3'

SEQ ID NO: 10

XhoI-VpF7GAT-Rv: 5'-CTC GAG TTT TTA CCC AAT AAC CAA CTT GAT-3'

PCR (KOD Plus Polimerasa, TOYOBO) fue empleado, después de la desnaturalización termal a 94° C. por 2 minutos, con [94° C. por 15 segundos., 50° C. por 30 segundos y 68° C. por 1.5 minutos.] x 35 ciclos. El fragmento de ADN amplificado fue sub clonado al vector pCR-Blunt II-TOPO (equipo de clonación Zero Blunt TOPO PCR, Invitrogen). La secuencia de nucleótido fue confirmada por ABI 3,100 analizador genético Avant (Applied Biosystems).

El plásmido fue completamente digerido con enzimas de restricción NdeI y XhoI, y el fragmento de ADN restante de aproximadamente 1.5 kb que contiene el largo completo ORF fue ligado al vector de expresión. *E. coli* pET- 15b (Novagen) en el sitio NdeI y XhoI para dar el vector de expresión *E. coli*

Ejemplo 3

Expresión y purificación de la proteína recombinante *Escherichia Coli*

Usando los respectivos plásmidos obtenidos previamente, la rama *E. coli* BL 21 (DE 3) fue transformada de una manera convencional. El transformante obtenido fue agitado cultivado en un medio LB de 4 ml (10 g/l triptona peptona, 5 g/l extracto de levadura, 1 g/l NaCl) conteniendo 50 ug/ ml de ampicilina a 37° C. por toda la noche. Cuando las células llegaron a su fase estacionaria, 4 ml del líquido

del cultivo fue inoculado dentro de un medio de 80 ml de la misma composición, seguido por cultivo en agitación a 37° C. En este punto cuando la turbidez de las células (OD 600) se convirtió aproximadamente 0.7, IPTD fue añadido a las células en una concentración final 0.5mM, seguido por agitación de la cultura a 22° C. Por 20 horas.

Los siguientes procedimientos fueron todos llevados a cabo a 4° C. El transformante cultivado fue recolectado por centrifugación (7,000 x g, 15 mins.) y 2 ml/ g células de buffer S [20 mM fosfato de sodio buffer (pH 7.4), 20 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 14 mM β -mercaptoetanol] para suspender las células. Subsecuentemente, ultrasonidos fue empleada (15 secs. X 8 intentos), seguido por centrifugación (15,000 x g, 10 mins.). Polietilenimina fue añadido al sobrenadante obtenido en una concentración final de 0.12% (p/v) y el resultado de la suspensión fue permitida mantenerse quieta por 30 minutos. Después de la centrifugación (15,000 x g, 10 mins.), el sobrenadante fue recuperado como una solución de encima en bruto. La solución de encima en bruto fue aplicada a su trampa espiral (GE Healthcare) equilibrada con Buffer S y después centrifugada (70 x g, 30 secs.). Después fue lavada con 600 μ l de Buffer S, la proteína unida a la columna fue eluida a través de pasos con 600 μ l cada uno de Buffer S conteniendo 100, 200 y 500 mM imidazol. En cada una de las fracciones eluidas, el buffer fue reemplaza con 20 mM de buffer de fosfato de potasio (pH 7.5) conteniendo 14 mM β -mercaptoetanol usando un Microcon YM-30 (Amicon).

Como resultado del análisis SDS- PAGE, la proteína purificada expresada aproximadamente 50 kDa deducida de la secuencia de aminoácido de VpF7GAT fue confirmada en la fracción eluida con 200 mM imidazol por lo tanto, esta fracción fue usada para el análisis de enzimas (FIG. 1, flecha: proteína del objetivo).

Ejemplo 4

Reacción de enzimas y análisis del producto

Las condiciones predeterminadas de la reacción son las siguientes. Después de 50 μ l de la solución de la reacción (2 mM ácido glucurónico- UDP, 100 μ M sustrato selector glicosil, 50 mM de buffer de fosfato de potasio (pH 7.5), solución de enzimas) fue preparada, la solución de enzimas fue añadida a y para iniciar la reacción. La mezcla fue reaccionada a 30° C. por un minuto. La reacción fue después terminada al añadir 50 μ l de CH₃CN conteniendo 0.5% TFA. El producto fue analizado por una fase revertida HPLC (LC-2010 System, Shimadzu Corporation).

Las siguientes son las condiciones para HPLC. Columna de velosil C30- UG- 5 (4.6 mm x 150 mm, Nomura Chemical) color de Colón a 40° C., y la fase móvil A (0.1% TFA/H₂O) y la fase móvil B (0.1% TFA/90% CH₃CN) las condiciones para la elución incluyen una gradiente lineal de densidad (B20%→B70%) por 15 minutos, después retención con B70% por 1 minuto más y después revirtiendo a B 20%, seguido por equilibración a 20 minutos. HPLC fue empleado en el flujo de 1 ml/

min. La detección fue llevada a cabo a 280 t 360 nm usando un detector de fotodiodo de matriz SPD/ M 10 A (Shimadzu Corporation). Bajo las condiciones, apigenina (Funakoshi) como estandar apigenina 7- O- glucurónido purificado de los pétalos de *Antirrhinum majus* y apigenina 7- O- glucósido (Funakoshi) fueron eluidos a lapsos de tiempo de retención de aproximadamente 11. 75 minutos, 8. 36 minutos y 8. 22 minutos, respectivamente (FIG. 2 (A): apigenina, FIG. 2 (C): apigenina 7- O- glucurónido).

La solución de reacción de enzimas obtenidas usando apigenina como el substrato selector glucosil ácido glucurónico- UDP como el donante glucosil fueron analizados por HPLC. Como resultado, la formación de un producto novedoso teniendo un tiempo de retención coincidente con apigenina 7- O- glucurónido usado como estándar fue confirmado (FIG. 2(B)).

Las condiciones para LC- MS son las siguientes. Columna usada: Develosil C30- UG- 3 (Nomura Chemical, 3.0 mm x 150 mm); fase móvil utilizada: agua conteniendo 0.1% ácido fórmico como agentes de elución A y como agentes de elución B 100% acetonitrilo conteniendo 0.1% ácido fórmico. Elución fue llevada a cabo usando una gradiente lineal de densidad (agentes de elución B: 20% → 70%) por 20 minutos, seguida por elución isocrática con 70% de agentes de elución B por 5 minutos (ritmo de flujo: 0.2 ml/rnin., horno de columna: 40° C.).

La detección fue lograda al coleccionar la información de 230-500 nm y monitoreando el cromatograma a A 337 nm usando un detector de gama de

fotodiodo (SPD-M10A, Shimadzu Corporation). A TOF-MS detector (Q-TOF Premier, Micromass, UK) fue conectado al detector PDA al respaldo. El peso molecular del producto fue determinado bajo las siguientes condiciones. MS fue determinado bajo las condiciones de medida en un modo negativo (fuente de ión: ESI, de resguardo de aerosol: leucina encefalinas (m/z 554.2615 $[M-H]^-$), capilar: 2.7 kV, cono: 30 V, MS/MS energía de colisiones: 20 eV).

Bajo las condiciones, apigenina el cual es el substrato eluido en el tiempo de retención de 17.51 minutos dio iones moleculares de m/z 269.0441 $[M-H]^-$. Por otra parte, en el tiempo de retención el producto eluido de 11.72 minutos dio iones moleculares de m/z 445.0759 $[M-H]^-$, y fue identificado como teniendo un ácido glucurónico pegado a la apigenina (FIG. 2(D)). Aún más a través de análisis MS/MS, los iones fragmentados de m/z 269.0450 $[M-H]^-$ que coinciden con apigenina fueron detectados en este producto.

Los siguientes resultados revelaron que esta enzima fue encontrada como una proteína que tiene actividad F7GAT de *Veronica pèrsica*.

Ejemplo 5

Análisis de las funciones de las enzimas de VpF7GAT

La selectividad de esta enzima a los donantes glicosil de UDP (substrato selector glicosil: apigenina) fue determinado de una forma similar al método de Noguchi, A. et al., Plant J. 54, 415-427, 2008. Cuando la actividad del ácido glucurónico –UDP fue creado al 100 %, la actividad relativa de la glucosa UDP fue

5.8% y la de la galactosa UDP fue a un nivel por debajo del límite de detección. La alta especificidad de esta enzima al ácido glucurónico UDP fue por lo tanto confirmada. Aún más, las especificidades del sustrato (K_m) de esta enzima a la apigenina y al ácido glucurónico UDP fueron $10.7 \pm 1.7 \mu\text{M}$ y $36.6 \pm 8.7 \mu\text{M}$, respectivamente, y la actividad catalítica (k_{cat}) para la apigenina fue de 8.64 S^{-1} .

La selectividad de esta enzima al sustrato aceptante glicosil (donantes glicosil: ácido glucurónico UDP) fue examinada. Esta enzima demostró la mayor actividad al sustrato de apigenina endógeno (FIG. 3). Cuando la actividad a esta apigenina fue llevada a cabo a un 100%, las actividades relativas de escutelareína, baicaleína, luteolina, diosmetina y chrysoeriol los cuales son flavonas; quercetina y kaempferol los cuales son flavonol; y naringenina el cual es un flavanona fueron 88.3%, 13.1%, 14.9%, 12.9%, 34.0%, 1.0%, 13.3%, y 18.0%, respectivamente.

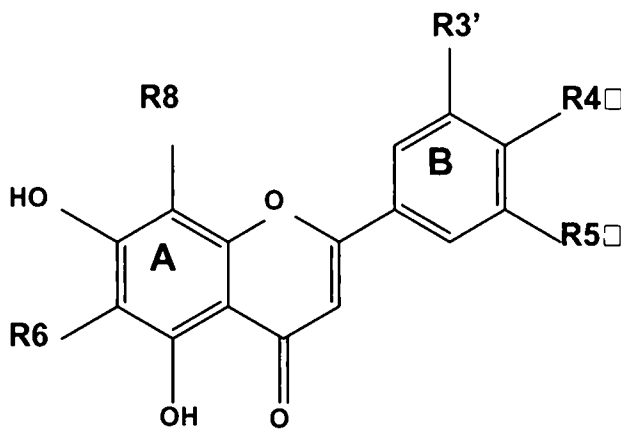
Especialmente en diosmetina en el cual el 4'-hidroxi en el aro flavonoide B es metilado y en los flavonoides que tienen 2 o más grupos hidroxilo en el aro B, la actividad de esta enzima fue menor que la de las que tienen un único grupo hidroxilo en la 4' posición. Adicionalmente, ya que la actividad a baicaleína teniendo ningún grupo hidroxilo en el aro B fue menor, el grupo hidroxilo 4' en el aro B flavonoide fue redondeado al ser extremadamente importante para el reconocimiento del sustrato selector glicosil.

También bajo las condiciones de reacción para esta enzima, la actividad de transferasa glucuronosilo no fue observada para resveratrol el cual es estilbenos, esculetina el cual es cumarinas, sesaminol el cual es lignano, daidzeína y genisteína los cuales son isoflavonas, y isovitexina y orientina los cuales son glucósidos- C de flavona. Entre flavonoides, estas enzimas se demostraron que tenían una fuerte actividad especialmente en las flavonas que tienen el grupo hidroxilo en la 4' posición en el aro B.

Flavonas: apigenina, luteolina, diosmetina, chrysoeriol, baicaleína y escutelareína

C- glucósidos de Flavona: isovitexina y orientina

En las siguientes fórmulas. Glc representa glucosa.



Apigenina (R4'=OH)

Luteolina (R3'= OH, R4'= OH)

Diosmetina (R3'= OH, R4'= OCH₃)

Chrysoeriol (R3'= OCH₃, R4'= OH)

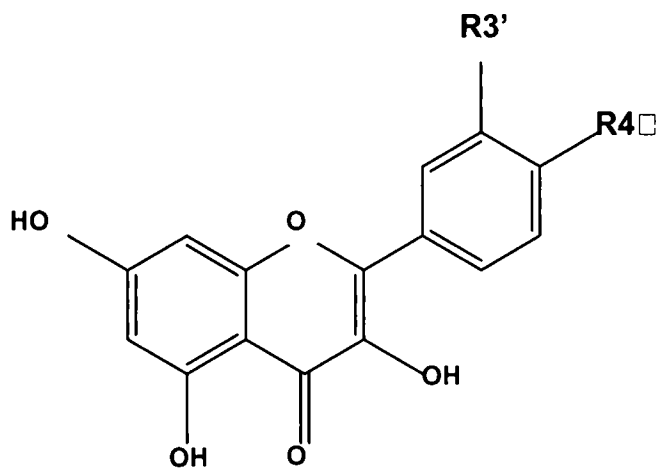
Baicaleína (R6= OH)

Escutelareína (R4'= OH, R6= OH)

Isovitexina (R4'=OH, R6=C-Glc)

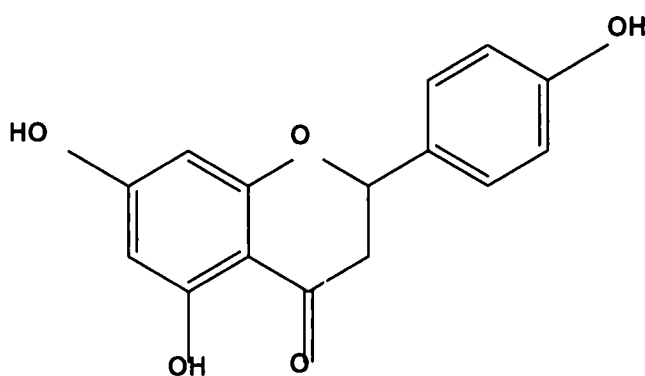
Orientina ($R_3'=\text{OH}$, $R_4'=\text{OH}$, $R_8=\text{C-Glc}$)

Flavonol: quercetina y kaempferol



Kaempferol ($R_4'=\text{OH}$)

Quercetina ($R_3'=\text{OH}$, $R_4'=\text{OH}$)



Flavanona: naringenina

Naringenina

Ejemplo 6

Análisis de expresión del gen VpF7GAT

El patrón de expresión del gen VpF7GAT en distintos órganos fue analizado por usando el sistema de tiempo real PCR RT- PCR 7500 cuantitativo (Applied Biosystems) de una forma similar al método de Noguchi, A. et al., Plant J. 54, 415-427, 2008. El ARN total fue extraído del órgano respectivo (hojas, flores, frutas, tallos y raíces) de *Veronica persica* de una forma similar al ejemplo 1. Después, 1 ug de cada órgano fue sujeto a transcripción reversa (RT) para dar el cADN de cada órgano. Éste cADN fue usado como un plantilla para el PCR.

Los siguientes 4 genotipos fueron diseñados como los genotipos específicos a cada gen usado en el PCR cuantitativo, usando un programa genotipos Express 3.0 (Applied Biosystems). Los genotipos específicos a VpF7GAT usados fueron aquellos de SEQ ID NOS: 11 y 12. Ribosoma ARN (AF509785) de *Veronica*

pérsica fueron dotados como el gen interno estándar. La amplificación fue efectuada usando genotipos específicos para cada gen de SEQ ID NOS: 13 y 14 como se muestran de aquí en adelante.

SEQ ID NO: 11

qVpF7GAT-Fw: 5'-GCG GTT TCG GCC TCT GT-3'

SEQ ID NO: 12

qVpF7GAT-Rv: 5'-TCC GAT ATC TTG AGG GAT GAT TTC-3'

SEQ ID NO: 13

qVprRNA-Fw: 5'-GCG GAA GGA TCA TTG TCG AT-3'

SEQ ID NO: 14

qVprRNA-Rv: 5'-CTA GCG GGC GGA GCT TAT TA-3'

El nivel de expresión de VpF7GAT fue hecho estándar por el nivel de expresión del gen interno estándar. El nivel de expresión relativo fue determinado por el método $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems). El resultado reveló que el gen VpF7GAT fue altamente expresado en los pétalos (FIG. 4). Ya que el sitio de la acumulación de 7- O- ácido glucurónico de flavona dado por esta enzima coincide con la región en la que el gen para esta enzima fue expresada, se sugiere fuertemente que esta enzima sea usada en el desarrollo del color de la flor de *Verónica persica* a través de la formación de un copigmento. Adicionalmente, ningún desarrollo de color notable fue observado incluso después que la expresión del VpF7 GAT fue reconocida también en las hojas. Esto se considera causado por

la cantidad mayor del pigmento de color antocianina ya que fue extremadamente baja al comparar la a la cantidad en los pétalos.

Como se describió previamente, la enzima (VpF7GAT) que puede transferir ácido glucurónico a la posición 7- O del flavonoide puede ser aislada para formar *Verónica pérsica*. Al usar esta enzima, las plantas con flores de color modificadas (ej., flores azules) pueden ser producidas y materiales alimenticios funcionales pueden ser desarrollados.

Aplicación industrial

La transferasa glucuronosilo UDP de la presente invención tiene una especificidad de sustrato más amplia y es útil para la producción de varios conjugados glucurónidos. Al usar la transferasa glucuronosilo de la presente invención, por ejemplo, plantas con colores de flor modificados (ej., flores azules) o materiales alimenticios funcionales pueden ser desarrollados.

Fig. 1



Fig. 2

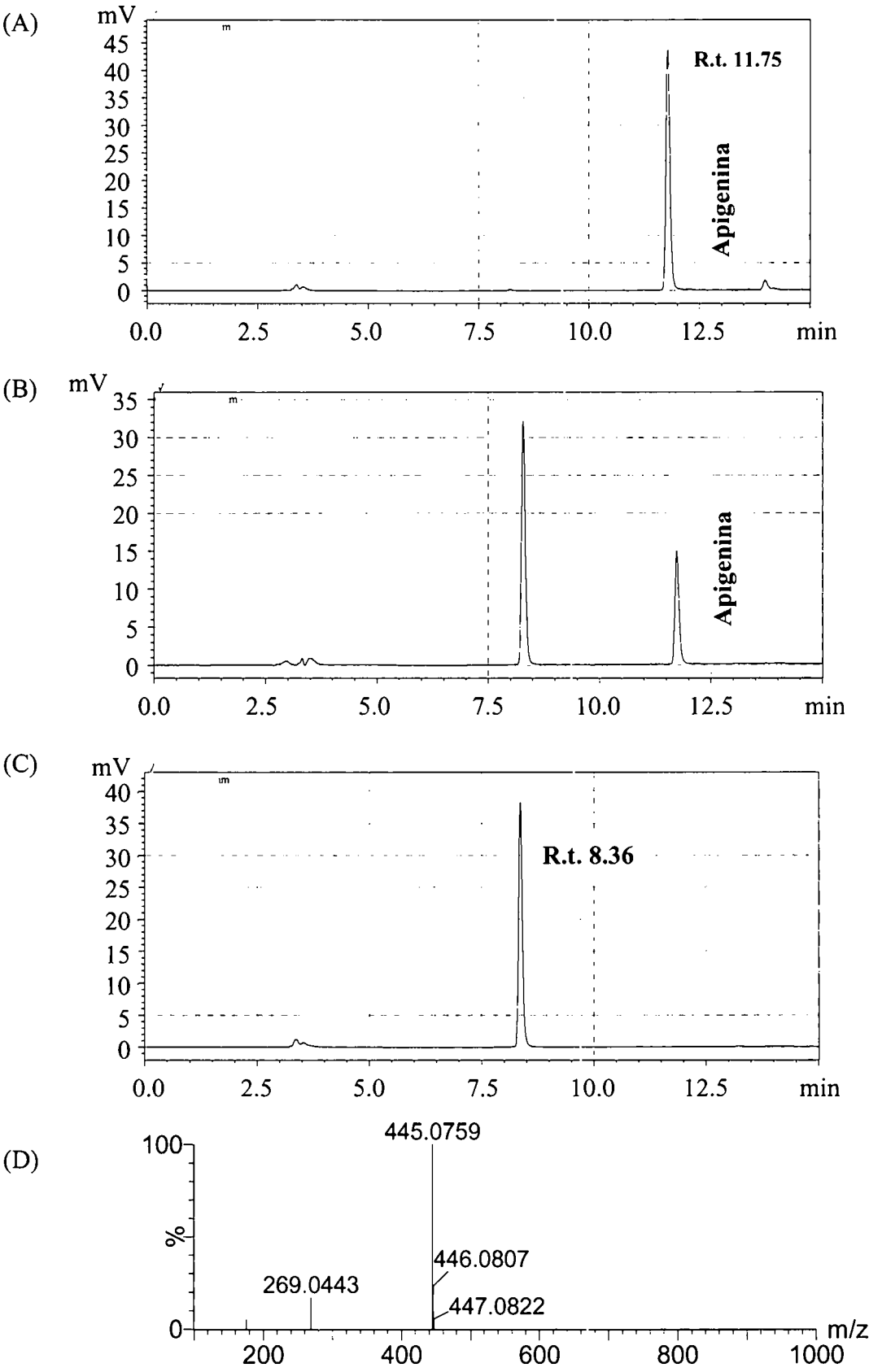


Fig. 3

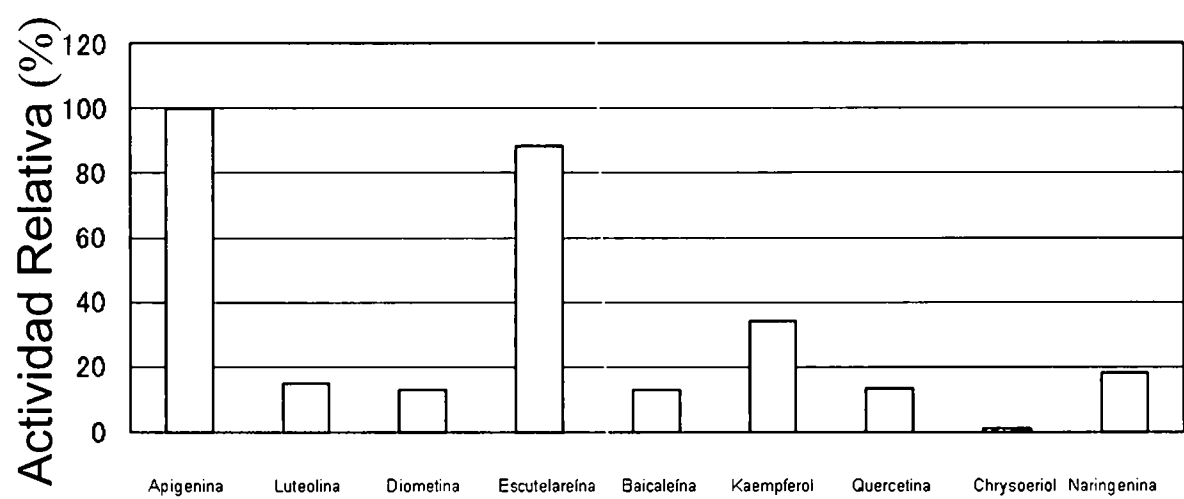
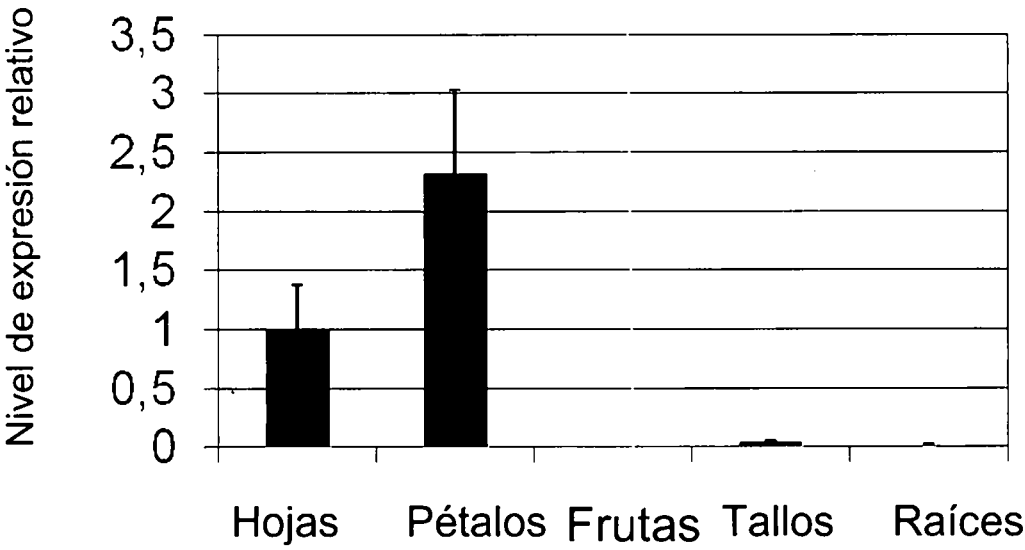


Fig. 4



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

e / *

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0018660

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411748374	01/03/2011	36.726.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN N. CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	118.000.00	118.000.00
				\$118.000.00

SON: **CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-025903- -00001-0000

Fecha: 2011-03-09 10:53:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 51

0010: 17511-841-002-6

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:06