

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 272 115**

21 Número de solicitud: 200400346

51 Int. Cl.:

**C12N 9/86** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **13.02.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2007**

Fecha de la concesión: **22.02.2008**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2008**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2008**

73 Titular/es: **Universidad de Murcia**  
**Avda. Teniente Flomesta, 5**  
**30003 Murcia, ES**

72 Inventor/es: **Sánchez Ferrer, Álvaro;**  
**Martínez Martínez, Irene;**  
**García Pizarro, Emiliano y**  
**García Carmona, Francisco**

74 Agente: **Dávila Baz, Ángel**

54 Título: **Producción de formas quiméricas de cefalosporina C acetilasa.**

57 Resumen:

Producción de formas quiméricas de cefalosporina C acetilasa.

Un procedimiento para producir una Cefalosporina C acetilasa de *Bacillus subtilis* y su utilización para la síntesis de derivados desacetilados de cefalosporinas. El procedimiento incluye la creación de una secuencia inédita del gen del *Bacillus subtilis* mediante combinación de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región de unión del sustrato de la cepa ATCC 6633 con la secuencia de nucleótidos correspondiente a la región catalítica de la cepa 168. Asimismo, el procedimiento describe la traducción y sobreexpresión de dicha secuencia de nucleótidos en una proteína híbrida con actividad cefalosporina C acetilasa, a un nivel por encima del 65% de las proteínas de la célula hospedante. Finalmente, se incluye un procedimiento para su aislamiento de los medios y para generar derivados desacetilados de cefalosporinas a partir de formas inmovilizadas de dicha enzima quimérica.

ES 2 272 115 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Producción de formas quiméricas de cefalosporina C acetilasa.

5 Un procedimiento para producir una Cefalosporina C acetilasa de *Bacillus subtilis* y su utilización para la síntesis de derivados desacetilados de cefalosporinas.

## Sector de la técnica

10 La presente invención, se encuadra principalmente en el área de biotecnología y más específicamente en el área de la tecnología enzimática. La presente invención describe la clonación de una cefalosporina C acetilasa (CCA) quimérica a partir de las mitades estructurales de dicho gen obtenidas a partir de dos cepas distintas de *Bacillus subtilis*, una mitad N-terminal con el dominio de unión de sustrato y otra mitad C-terminal con el dominio catalítico; su sobreexpresión en células huésped compatibles con el vector de expresión; su aislamiento; y su uso para la preparación de desacetil-cefalosporinas, que son usadas como compuestos de partida en la obtención de cefalosporinas semisintéticas con capacidad antibiótica.

## Estado de la técnica

20 Las desacetil-cefalosporinas son compuestos de partida de gran importancia comercial en la preparación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos. Estos se obtienen fundamentalmente a partir de cefalosporina C o del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) mediante procesos químicos o enzimáticos. La hidrólisis química del resto acetilo de la posición 3 de las cefalosporinas da un bajo rendimiento ya que, a pH básicos, el doble enlace de la posición 3 del anillo  $\beta$ -lactámico migra a la posición 2 (Morin R. B. *et al.*, 1969, *J. Am. Chem. Soc.* 91: 1401-1407), y a pH ácidos, se produce una reacción irreversible de lactonización entre el 3-hidroximetil y el grupo 4-carboxilo adyacente (Kukulja, S., 1968, *J. Med. Chem.* 11: 1067-1069). Por tanto, la hidrólisis enzimática a pH 7.0 se ha convertido en el método más efectivo para preparar estos desacetil derivados con alto rendimiento.

30 El uso de esterasas para producir desacetil-cefalosporinas fue primeramente demostrado con la acetil esterasa de la corteza de cítricos (*Jeffrey et al.*, 1961, *Biochem. J.* 81: 591-596; US 3,202,656; EP 0 109 300). Posteriormente, otras esterasas y lipasas (*Carrea et al.*, 1996, *Biotechnol. Bioeng.* 52: 648-652) han sido publicadas y patentadas con la habilidad de desacetilar compuestos  $\beta$ -lactámicos. Entre los microorganismos donde ha sido encontrada esta actividad esterasa están *Aureobasidium* (EP 0 044 736), *Actinomyces* (*Demain et al.*, 1936, *J. Bacteriol.* 35: 339-344; EP 1 170 369; *Cardoma et al.*, 2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 406-412), *Schizosaccharomyces* (US 3,239,394), *Rhizobium* (US 3,436,310), *Rhodospiridium toruloides* (GB 2,060,610; *Politino et al.*, 1997, *Appl. Microbiol.* 30: 413-419), *Rhodotorula rubra* (GB 1 474 519) y algunas especies de *Bacillus* (WO 99/55881). Dentro de este último género, se han descrito varias cepas de *B. subtilis* en la bibliografía, pero en concreto *B. subtilis* SHS 0133 ó tipo 168 (EP 0 454 478) y *B. subtilis* ATCC 6633 (WO 99/38982) son de especial interés industrial en sus formas clonadas y sobreexpresadas en *Escherichia coli*. Sin embargo, no ha sido posible hasta la fecha combinar en una sola secuencia de nucleótidos codificando actividad cefalosporina C acetilasa o desacetilasa una alta capacidad catalítica con una alta expresión para de esa manera hacer rentable su explotación industrial.

45 Es por tanto objetivo de esta invención generar una secuencia de nucleótidos que codifique la secuencia de aminoácidos de una cefalosporina C acetilasa quimérica, que comparta la alta expresión con la alta actividad catalítica, a partir de las mitades N-terminal y C-terminal de las dos cepas de *B. subtilis* antes mencionadas. Es otro objetivo de la presente invención el desarrollo de vectores, en concreto de vectores de expresión que contengan la secuencia de nucleótidos de dicha quimera, y células huésped en las que se exprese dicho vector. Es otro objetivo adicional de la presente invención, generar el proceso de producción y aislamiento de dicha cefalosporina C acetilasa quimérica desde los cultivos de células huésped. Por último, es un objetivo de la presente invención describir un proceso de preparación de 3-desacetil-cefalosporinas mediante el uso de dicha cefalosporina C acetilasa quimérica.

## Descripción detallada de la invención

55 La cefalosporina C Acetilasa (CCA) del microorganismo *Bacillus subtilis* contiene en su estructura un dominio catalítico con la secuencia Gly-X-Ser-X-Gly similar a la encontrada en serín proteasas, esterasas y lipasas, siendo considerada como una serín esterasa.

60 Esta invención describe la construcción de una CCA quimérica activa que está compuesta por la combinación de dos mitades estructurales funcionalmente diferenciadas entre sí; donde la primera mitad estructural corresponde a la primera mitad estructural de la serín esterasa de una primera cepa de *B. subtilis*, y una segunda mitad estructural que corresponde a la segunda mitad estructural de la serín esterasa pero de una segunda cepa de *B. subtilis*.

65 De acuerdo con la invención se entiende como primera mitad estructural a la mitad estructural en la cual está localizado el extremo N-terminal y como segunda mitad estructural la mitad estructural en la cual está localizado el extremo C-terminal.

La CCA quimérica de esta invención es una quimera de cualquier cepa o mutante natural o artificial de *B. subtilis* que contenga actividad CCA. Una característica de esta invención es que la primera secuencia contiene la secuencia de

aminoácidos de la zona de unión al sustrato de dicha serín esterasa. En una realización preferida, la primera secuencia que contiene la región aminoacídica de unión al sustrato pertenece a la secuencia aminoacídica comprendida entre los aminoácidos 1 y 141 (el número de la secuencia de aminoácidos corresponde a la publicación de Yamane, K. *et al.*, 1996, *Microbiology* 142: 3047-3056) de *B. subtilis* ATCC 6633. Preferiblemente la segunda secuencia tiene una secuencia de aminoácidos que contiene el dominio y la triada catalítica de la serín esterasa comprendida entre los aminoácidos 142 y 318 (el número de la secuencia de aminoácidos corresponde a la publicación anteriormente citada de Yamane, K. *et al.*, 1996).

En la presente invención, la proteína quimérica tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a SEQ ID NO. 2 y una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO. 1. La proteína quimérica de esta invención puede ser obtenida mediante síntesis química o por biología molecular. Tales técnicas son conocidas en el arte. Cuando se hace mediante técnicas de ADN recombinante, primero se construye un vector de expresión que contenga el gen que codifica la proteína quimérica y que es capaz de expresarla, y luego se transforma o transfecta en una célula huésped procariota o eucariota. Tales técnicas son bien conocidas por los expertos. Ver por ejemplo Sambrook J. *et al.* (1989) en "Molecular cloning: A laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press); y Sambrook J. y Russel, D. W. (eds.) (2001) en "Molecular cloning: A laboratory Manual 3<sup>th</sup> Ed". (Cold Spring Harbor Laboratory Press). Esta invención también proporciona un proceso para producir la proteína quimérica de esta invención de manera recombinante, que consiste en expresar la proteína en una célula huésped que contiene un vector de expresión con la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, donde la expresión de dicha secuencia de nucleótidos está bajo el control de un elemento de control transcripcional, y por último el aislamiento de la proteína expresada. Particularmente útiles como vectores de expresión pueden ser, por ejemplo, pKK223-2 (GenBank Access No M77749) o pK19 (Pridmore, R., D., 1987, *Gene* 56: 309-312), que contienen un promotor adecuado para ser funcional en la célula hospedante (por ejemplo Lac, Tac, Trc, Trp o P1) y una zona de unión al ribosoma (secuencia *RBS* o *SD*). Es particularmente preferido en esta invención un vector conteniendo el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (abreviada de aquí en adelante como T7 ARN polimerasa) y que contenga múltiples sitios de clonaje, tales plásmidos son conocidos como pT o pET y fueron descritos por Studier F. W. y Moffatt B.A. (1986, *J. Mol. Biol.* 189: 113-130). Estos últimos se pueden obtener comercialmente de Novagen (Madison, Wisconsin, USA). Los vectores pET se clasifican en series desde pET 3 hasta pET 46, siendo particularmente preferidos en esta invención los de la serie pET 28 debido a que incluyen resistencia al antibiótico kanamicina, no interfiriendo con el método de medida de actividad de la enzima. El plásmido pET28a es particularmente preferido.

Células hospedantes típicas para dichos vectores de expresión son cepas bacterianas como por ejemplo *Escherichia coli* y preferiblemente aquellas que son lisógenas del bacteriófago  $\lambda$ DE3, ya que contiene al gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control de un promotor inducible LacUV5. En este sistema, la adición de isopropiltiogalactosa (IPTG) al cultivo induce la transcripción de la polimerasa, la cual a su vez comienza a transcribir la secuencia clonada en el plásmido. Un gran número de cepas de *E. coli* compatibles con dicho sistema de expresión están disponibles comercialmente, incluyendo DH5 $\alpha$ , las cepas HMS174(DE3) y las lisogénicas BL21(DE) y sus derivadas. Entre estas últimas cepas, BL21(DE)Lys es particularmente preferida con los plásmidos pET, y en concreto la cepa Rosetta, derivada de BL21(DE3)Lys, es particularmente preferida en esta invención.

Después de la inducción de la T7 ARN polimerasa, la cepa de *E. coli* se crece durante un tiempo bajo las condiciones suficientes para producir la proteína sobreexpresada en el cultivo. Cualquier tipo de medio sólido o líquido que permita el crecimiento y reproducción de *E. coli* será útil para desarrollar el método de esta invención, pero el medio líquido es preferido por facilitar el aislamiento de las proteínas sobreexpresadas. Son conocidos por el experto en la materia, numerosos medios de cultivo bacteriano, y una ventaja de la presente invención es que *E. coli* es relativamente fácil y barata de crecer. Los medios de cultivo típicos incluyen ambos medios mínimos y ricos. Entre los medios ricos están el medio LB, el NZL, el superbroth, el TY, el TYGPN y el TB. Los medios preferidos en esta invención son LB y TB.

Después del crecimiento de los cultivos, las células de *E. coli* son usualmente lisadas mediante "shocks" osmótico, sonicación, perlas de cristal u otras formas establecidas y la serín esterasa quimérica expresada es aislada de la fracción soluble. Cualquier método de purificación de proteínas puede ser usado para dicho propósito, como diálisis, ultrafiltración, nanofiltración, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad o combinación de varios de estos métodos. Según una realización preferida de la presente invención, la fracción soluble obtenida después de centrifugación y decantación de la fase acuosa de los restos celulares es la eliminación de los ácidos nucleicos con un polianión como polietilenimina (PEI) y posterior concentración por ultrafiltración tangencial sobre membranas con un corte molecular de 10000 Daltons, que son fácilmente disponibles comercialmente.

Una ventaja de esta invención es que la T7 ARN polimerasa sintetiza ARN a una velocidad varias veces mayor que la ARN polimerasa de *E. coli* y termina la transcripción con menor frecuencia. Además la T7 ARN polimerasa es altamente selectiva para su propio promotor y no inicia la transcripción de secuencias de DNA de *E. coli*, de esta manera la expresión de la serín esterasa quimérica puede ser maximizada.

Otra ventaja de la presente invención es que, bajo condiciones óptimas, pueden ser alcanzados extraordinariamente altos rendimientos de proteína expresada. Por ejemplo en la práctica de la invención, la CCA quimérica se acumula por encima del 50% de la proteína bacteriana total en el cultivo. Una característica preferida de esta invención es que la CCA quimérica se acumula por encima del 65% de la proteína bacteriana total.

Sorprendentemente, en la presente invención la quimera producida, al contrario de las serín esterases iniciales y debido a su alta expresión comparada con el resto de las proteínas de *E. coli*, es muy fácil de purificar, permitiendo así una producción económica a gran escala de la misma para su uso industrial. En otra característica de la invención, la forma quimérica de CCA puede ser empleada en forma libre, o también puede ser inmovilizada en soportes sólidos, los cuales son de gran utilidad industrial para los procesos de bioconversión de cefalosporinas naturales o sintéticas que contengan en su posición 3 un grupo acetoximetil, en particular el ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA), cefalosporina C o cualquier acil derivado de 7-ACA. Compuestos usados de forma preferible en esta invención son 7-ACA y cefalosporina C, que son convertidos en el ácido 7-amino-3-desacetil cefalosporánico (7-DACA) y 3-desacetil cefalosporina C. Las condiciones de reacción son familiares para un especialista y corresponden a las descritas para la acción de una cefalosporina C acetilasa nativa (no recombinante) (ver por ejemplo las descritas por Fujisawa Y. *et al.*, 1973, *Nat. New Biol.* 246: 154-155).

Esta invención será detallada a continuación, mediante los siguientes ejemplos ilustrativos, que en ningún caso limitarán el alcance de la misma. En particular, los ejemplos están relacionados con las características preferidas de la presente invención.

### Ejemplos de la realización de la invención

#### Ejemplo 1

##### Clonación del gen de CCA de dos cepas distintas de *B. subtilis*

El ADN genómico de dos cepas de *B. subtilis* (cepa 168 y ATCC 6633) se aisló por métodos estándar (DNeasy system, Qiagen, Valencia, CA, USA) o cualquier otro método fiable, y se usó como molde para la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) llevada a cabo según el método estándar (Thamomsu, B. *et al.*, 1995, *Microb. Util. Renewable Resour.* 9: 395-399). Oligonucleótidos cebadores (primer) fueron diseñados basándose en la secuencia nucleotídica del gen CCA de *B. subtilis* (Yamane, K. *et al.*, 1996, *Microbiology* 142: 3047-3056; número de acceso al NCIB Entrez Nucleotide Database D50453). Los oligonucleótidos cebadores específicamente diseñados N1 (SEQ ID NO. 3) y N2 (SEQ ID NO. 4)

N1: 5'-GCGGCCGCATGCAACTATTTCGATCTGCCGCTCGAC

N2: 5'-GCGGCCGCTCAGCCTTTAAGATGCTGCTTAAAGAA

incluyen el sitio de restricción para el enzima *NotI*. De este modo puede hacerse uso posterior del sitio de restricción para dicha enzima que posee el vector pET28a en el sitio de clonación múltiple.

Tras la reacción de PCR el producto obtenido se purifica, se digiere con la enzima de restricción *NotI*, obteniendo fragmentos de aproximadamente 957 pares de bases tanto para el ADN de *B. subtilis* 168 como para el de *B. subtilis* ATCC 6633. Tras estimar la concentración, los dos productos de PCR fueron ligados en el vector de expresión pET28a previamente digerido con la misma enzima de restricción *NotI*. Los productos de la ligación se transformaron en *E. coli*. DH5 $\alpha$ , se sembraron sobre placas LB-agar conteniendo 25  $\mu$ g/mL de kanamicina y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Las colonias resultantes son analizadas para confirmar la clonación correcta del gen recombinante de CCA de ambas cepas mediante PCR de colonias y por análisis de restricción. Los plásmidos considerados positivos, que se designaron respectivamente como pET28a-BsCCA168 y pET28a-BsCCA6633, fueron secuenciados, observándose que la secuencia insertada en pET28a-BsCCA168 corresponde a la publicada en la patente EP 0 454 478 para cefalosporina C desacetilasa (número de acceso al NCIB Entrez Nucleotide Database D10935) y que la secuencia insertada en pET28a-BsCCA6633 corresponde a la publicada en la patente US 6,465,233 (número de acceso al NCIB Entrez Nucleotide Database AR236734) para cefalosporina acetilsterasa.

#### Ejemplo 2

##### Construcción de genes quiméricos de CCA

Para la realización de construcciones quiméricas los genes de CCA clonados anteriormente se decidió fusionar la mitad N-terminal con el dominio que contiene el sitio de unión al sustrato de la cepa 168 con la mitad C-terminal con el dominio catalítico de la cepa ATCC 6633 (construcción 168/6633), y viceversa (construcción 6633/168). Para conseguir este propósito se introduce una mutación silenciosa en la secuencia del gen recombinante contenido en el plásmido pET28a-BsCCA6633 en la posición 426, cambiando citosina por timina. Esto introduce un nuevo sitio de corte *EcoRI* sobre el gen de ATCC 6633 en la misma posición que lo tiene la cepa 168, para ello se usan los oligonucleótidos cebadores N3 (SEQ ID NO. 5) y N4 (SEQ ID NO. 6)

#### *EcoRI*

N3: 5'-GGATGACGAAAGGAATtCTTGATAAAGATACATACTATTACC

## ES 2 272 115 B1

### *EcoRI*

N4: 5'-GTATCTTTATCAAGAATtCCTTTTCGTCATCCAGCCCAAAGC

5 en los cuales la mutación introducida va en minúscula.

La mutación deseada fue introducida mediante reacción de PCR usando el gen CCA de *B. subtilis* ATCC 6633 mediante las parejas de cebadores N1/N4 y N2/N3. Tras la PCR se aíslan dos productos amplificados, uno de aproximadamente 430 pares de bases correspondiente al producto de los cebadores N1/N4; y otro de aproximadamente 530 pares de bases correspondiente al producto de los cebadores N2/N3. Dichos fragmentos purificados son ahora usados como molde para una nueva PCR en presencia de los cebadores N1 y N2, dando lugar a un nuevo gen de CCA de *B. subtilis* ATCC 6633 con un sitio de *EcoRI* en la posición 426. Este fragmento es aislado, purificado y digerido con *NotI* y ligado al vector pET28a abierto con dicha enzima de restricción, generando el plásmido pET28a-*BsCCA6633Eco*. Seguidamente este último plásmido y el pET28a-*BsCCA186* son digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* dando lugar en ambos casos a dos fragmentos: uno pequeño de aproximadamente 450 pares de bases que corresponde al espacio entre el sitio de corte *EcoRI* del sitio de clonación múltiple del vector y el sitio *EcoRI* del gen CCA en la porción 425 situado en el extremo 5' del gen; y un segundo segmento grande de aproximadamente 5900 pares de bases, que es el extremo 3' del gen más el resto del vector pET28a. La ligación cruzada de esos 4 fragmentos de ADN nos dará los plásmidos conteniendo las enzimas quiméricas y que son designadas como pET28a-*BsCCA168/6633* para la quimera que contiene la mitad 5' del gen CCA de 168 y la mitad 3' del gen CCA de ATCC 6633; y pET28a-*BsCCA6633/168* para la que contiene la mitad 5' del gen CCA ATCC 6633 y la mitad 3' del gen CCA de 168.

5 Ambos productos de ligación fueron transformados en células competentes de *E. coli* DH5a y sembrados sobre placas LB-agar conteniendo 25 µg/mL de kanamicina durante 16 horas a 37°C. Las colonias resultantes son estudiadas para confirmar la correcta clonación de ambos genes quiméricos mediante PCR de colonias y análisis de restricción. Posteriormente, los genes fueron secuenciados, obteniéndose en el caso del gen quimérico CCA 6633/168 un fragmento de 957 pares de bases cuya secuencia de nucleótidos se muestra con SEQ ID NO. 2. La traducción de dicha secuencia resulta en una proteína de 318 aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 1.

30

### Ejemplo 3

#### *Expresión de las distintas CCA clonadas en E. coli*

35

Los plásmidos recombinantes preparados en los anteriores ejemplos 1 y 2 fueron usados para transformar las células competentes de *E. coli* Rosetta (Novagen, Madison, WI, USA), que es la cepa seleccionada en esta invención para maximizar la expresión. Dichas células fueron cultivadas en 1000 mL de medio LB a 37°C durante 4 horas, siendo entonces inducidas con 0.5 mM de IPTG durante 12 horas a 22°C. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 5300 g durante 10 minutos a 4°C y resuspendidas en 150 mL de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. El contenido de las células fue liberado mediante homogeneización con perlas de vidrio en un sistema Bead Beater® (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). El extracto celular resultante fue de nuevo centrifugado bajo las condiciones antes citadas y al sobrenadante se le añadió un polímero (polietilenglicol) al 0.1% para poder precipitar los ácidos nucleicos del extracto. Tras su centrifugación a 5300 g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante es concentrado mediante ultrafiltración tangencial (corte molecular 10000 Daltons).

45

La disolución concentrada así obtenida fue sometida a fraccionamiento con sulfato amónico entre el 30 y el 85%, obteniéndose un extracto enzimático que tras ser dializado es utilizado como material de evaluación de la expresión génica sobre 7-ACA como sustrato.

50

Una cantidad fija de enzima parcialmente purificada según lo descrito anteriormente (300 µg) de cada uno de los transformantes de los Ejemplos 1 y 2 fue incubada en presencia de 7-ACA 75 mM en tampón fosfato 100 mM pH 7.0 a 25°C en un volumen final de 10 mL durante 30 minutos. La cantidad de ácido 7-amino-3-desacetilcefalosporínico (7-DACA) generado fue seguida por HPLC a 254 nm, en una columna de fase inversa (Zorbax C8, 5 µm 150 x 4,6 mm), con una fase móvil compuesta por sulfato ácido de tetrabutilamonio 14 mM fosfato diácido de potásico 15 mM pH 6.5 y un 32% de metanol; y a un flujo de 1 mL/min.

55

Bajo esas condiciones de HPLC, los compuestos β-lactámicos desacetilados salen antes (7-DACA a los 2.4 minutos) y los 3 acetoximetil β-lactámicos después (7-ACA a los 3.8 minutos). Las actividades expresadas por en cada una de las construcciones fueron:

60

65

## ES 2 272 115 B1

Plásmido	$\mu$ moles de 7-ACA desacetilado/min-mL cultivo de (U/mL)	$\mu$ moles de 7-ACA deacetilado/min-mg (U/mg)
5 pET28a-BsCCA 168	4.1	7.2
pET28a-BsCCA 6633	3.4	10.0
pET28a-BsCCA 6633/168	70.2	32.9
10 pET28a-BsCCA 168/6633	2.1	3.7

De la tabla anterior se deduce que la CCA quimérica obtenida del plásmido pET28a-BsCCA 6633/168 es la más activa (U/mg) de las ensayadas con valores entre 3 y 5 veces más activa que las parentales. Sorprendentemente, la quimera del plásmido pET28a-BsCCA 168/6633 tiene significativamente menor actividad que las parentales, lo que indica que no es obvio que la generación de quimeras traiga consigo aumento en la actividad con respecto a las proteínas parentales. Para ver si esta alta actividad se debía a una alta expresión de la proteína recombinante del plásmido pET28a-BsCCA 6633/168, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. Para ello, se usó el extracto proteico (2  $\mu$ g) obtenido tras la ultrafiltración tangencial de las células de *E. coli* Rosetta con y sin el plásmido pET28a-BsCCA 6633/168, observándose mediante tinción de plata, que las proteínas de *E. coli* Rosetta son apenas visibles tras la inducción de la forma quimérica de CCA 6633/168, siendo esta CCA quimérica la proteína mayoritaria, constituyendo más del 65% de la proteína total.

Por tanto, la proteína quimérica con actividad cefalosporina C acetilasa así obtenida, está compuesta por una primera secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de unión al sustrato de la cefalosporina C acetilasa de *Bacillus subtilis* cepa ATCC 6633, y una segunda secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal donde está el centro catalítico de la cefalosporina C acetilasa de *Bacillus subtilis* cepa 168. La primera secuencia contiene la secuencia de aminoácidos del 1 al 141 del dominio N-terminal, y la segunda secuencia contiene la secuencia de aminoácidos del 142 al 318 del dominio C-terminal

### Ejemplo 4

#### Caracterización cinética de la enzima quimérica CCA 6633/168

La reactividad de la enzima quimérica CCA 6633/168 fue estudiada con dos sustratos de interés industrial, el T-ACA y la cefalosporina C. La reacción se siguió mediante HPLC y se llevó a cabo a 25°C variando la concentración de 7-ACA y cefalosporina C entre 0 a 100 mM en presencia de tampón fosfato 100 mM pH 7.5 ó pH 7.8, que son los pHs óptimos para 7-ACA y cefalosporina C, respectivamente. El pH se mantuvo constante mediante la tritaci3n del ácido acético liberado por la acción de la enzima en un sistema tritador (*Tritino STAT 716, Metrohm, Suiza*) con una solución 0.5 M de NaOH. Los resultados obtenidos, tras ser ajustados los datos a la ecuación de Michaelis-Menten, fueron los siguientes:

Sustrato	Km (mM)	Vmax ( $\mu$ mol/min*mg)
45 7-ACA	12.4	39.2
Cefalosporina C	39.2	21.5

Estos resultados indican que la enzima quimérica es más activa sobre 7-ACA que sobre cefalosporina C.

### Ejemplo 5

#### Fermentación e inmovilización

La cepa transformada *E. coli* Rosetta conteniendo el plásmido pET28a-BsCCA 6633/168 fue crecida en 200 mL de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 3. Momento en que dichas células se utilizan como inóculo de un fermentador de 2 L (*Biostat B, Braun Biotech, Alemania*) conteniendo 1800 mL de medio TB-kanamicina (24 g/L de extracto de levadura, 12 g/L de bacto triptona,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  720 mM, 0.4% de glicerol con 25  $\mu$ g/mL de kanamicina). La fermentación fue mantenida a 37°C con agitación (500 rpm), aireación (0.7 v.v.m) y pH (pH 7.0) constantes, hasta que el cultivo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento. En ese momento se añadió 0.5 mM de IPTG para iniciar la expresión de la CCA quimérica y se mantuvo 4 horas a 30°C. Al final de la fermentación se obtuvieron 20 g de peso seco y 89 U/mL sobre 7-ACA 75 mM en tampón fosfato 100 mM pH 7.0 y 37°C, correspondientes a 21 U/mL sobre Cefalosporina C 75 mM bajo las mismas condiciones.

La enzima obtenida de la fermentación fue clarificada con 0.1% de polietilenimina y ultrafiltración tangencial. Esta solución quimérica (30 mL, 12895 U totales sobre 7-ACA) fue mezclada con 8 g de Eupergit C y 20 mL de tampón fosfato potásico 1 M, pH 8. Después de 64 horas agitándose suavemente a temperatura ambiente, el soporte

## ES 2 272 115 B1

fue separado de la disolución y lavado con tampón fosfato 0.1 M, pH 7. Finalmente, se obtuvieron 1205 U/g peso seco y se recuperaron 9640 U de las inicialmente puestas.

### Ejemplo 6

5

#### *Hidrólisis del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) a ácido 7-amino-3-desacetil-cefalosporánico (7-DACA)*

La enzima inmovilizada del Ejemplo 5 (1 g de peso seco) fue incubada con 100 mL de 7-ACA 75 mM en agua y tritiada a pH 7.5 con amoníaco 3 M a temperatura ambiente. La reacción fue seguida por HPLC hasta la total  
10 conversión de 7-ACA en 7-DACA. Dicha reacción terminó a los 40 minutos, no dando otros productos secundarios. La actividad recuperada tras la transformación enzimática fue de 1203 U/g de peso seco.

### Ejemplo 7

#### 15 *Comparativa sobre los niveles de sobreexpresión de la CCA quimérica con otros publicados*

El nivel de expresión del plásmido pET28a-BsCCA 6633/168 en *E. coli Roseta* puede ser comparado con otros genes de *B. subtilis* con actividad CCA, previamente patentados, en la siguiente tabla:

20

	7-ACA	Cefalosporina C	
	U/mL	U/mL	U/g peso seco
25 EP 0454478	7.4	7.4	----
WO 9938982	----	----	455
Esta invención	89	21	2100

25

30

Como se describe anteriormente, la presente invención permite mediante la generación de una enzima quimérica a partir de dos mitades estructurales del gen de la Cefalosporina C acetilasa de dos cepas de *B. subtilis*, la sobreproducción de dicha enzima en cantidades suficientemente altas para su aplicación en la bioconversión de distintos substratos  $\beta$ -lactámicos con grupos acetoximetil en su posición 3'. Posteriormente se puede aislar el compuesto  $\beta$ -lactámico 3-deacetilado así obtenido, si se requiere.

35

La descripción realizada anteriormente tiene el propósito de mostrar a una persona versada en el tema como llevar a cabo la presente invención, y no intenta detallar todas aquellas modificaciones y variaciones obvias de ella, surgidas tras su lectura. Se entiende, sin embargo, que tales modificaciones y variaciones obvias están incluidas en el espíritu y objetivo de la presente invención, tal y como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína quimérica con actividad cefalosporina C acetilasa, **caracterizada** porque está compuesta por una primera secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de unión al sustrato de la cefalosporina C acetilasa de *Bacillus subtilis* cepa ATCC 6633, y una segunda secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal donde está el centro catalítico de la cefalosporina C acetilasa de *Bacillus subtilis* cepa 168, donde la cefalosporina C acetilasa quimérica tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 1.
- 10 2. Una proteína quimérica según reivindicación 1, **caracterizada** porque la primera secuencia contiene la secuencia de aminoácidos del 1 al 141 del dominio N-terminal.
3. Una proteína quimérica según reivindicación 1, **caracterizada** porque la segunda secuencia contiene la secuencia de aminoácidos del 142 al 318 del dominio C-terminal.
- 15 4. Una secuencia de nucleótidos del gen quimérico de cefalosporina C acetilasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque contiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO. 2.
- 20 5. Una secuencia de nucleótidos del gen quimérico de cefalosporina C acetilasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque su traducción da lugar a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1.
6. Un vector de expresión compatible con una célula huésped predeterminada, **caracterizado** porque contiene la secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 4 y 5.
- 25 7. Un vector de expresión según la reivindicación 6, **caracterizado** porque contiene el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7.
8. Una célula huésped **caracterizada** porque está transformada por un vector de expresión según las reivindicaciones 6 y 7.
- 30 9. Un procedimiento de producción de la cefalosporina C acetilasa quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado** porque de los siguientes pasos:
- 35 a) Cultivar bajo condiciones capaces de producir la expresión de la cefalosporina C acetilasa, células huésped transformadas con un vector según la reivindicación 5
- b) Expresar la proteína quimérica de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 1
- c) Recuperar la cefalosporina C acetilasa expresada del cultivo, si se considera necesario.
- 40 10. Un procedimiento para la desacetilación de compuestos  $\beta$ -lactámicos, **caracterizado** por convertir el compuesto  $\beta$ -lactámico que tiene un grupo acetoximetil en la posición 3 usando la cefalosporina C acetilasa quimérica, donde la cefalosporina C acetilasa tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 1 y la cual es empleada en forma libre o inmovilizada.
- 45 11. Procedimiento según reivindicación 10, **caracterizado** porque se aísla el compuesto lactámico  $\beta$ -deacetilado así obtenido.
- 50 12. Un procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el compuesto R-lactámico con un grupo acetoximetil en la posición 3 es el ácido 7-aminocefalosporánico o un 7-acil derivado de él.
13. Un procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el 7-acil derivado del ácido 7-aminocefalosporánico es cefalosporina C.
- 55 14. Uso de la cefalosporina C acetilasa quimérica de la SEQ ID NO. 1 para la preparación de desacetil-cefalosporinas empleadas como compuestos de partida para obtener cefalosporinas semisintéticas con capacidad antibiótica.
- 60
- 65



# ES 2 272 115 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Murcia

5 <120> Producción de formas quiméricas de cefalosporina C acetilasa

<130> cefalosporina C acetilasa

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 318

<212> PRT

20 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CCA quimérica 6633/168

25 <400> 1

Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro  
1 5 10 15

30

Glu Lys Thr Thr Pro Asn Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Ser Ser Leu  
20 25 30

35

Asp Glu Leu Ala Lys Val Lys Ala Ala Pro Asp Leu Gln Leu Val Asp  
35 40 45

40

Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe  
50 55 60

45

Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Glu Gly  
65 70 75 80

50

Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp  
85 90 95

55

Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala  
100 105 110

60

Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile  
115 120 125

65

Ser Pro His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp  
130 135 140

Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala  
145 150 155 160

## ES 2 272 115 B1

	Leu	Glu	Val	Ile	Ser	Ser	Phe	Asp	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Arg	Ile	Gly
					165					170					175	
5	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala
			180					185						190		
10	Leu	Ser	Asp	Ile	Pro	Lys	Ala	Ala	Val	Ala	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ser
			195					200					205			
15	Asn	Phe	Glu	Arg	Ala	Ile	Asp	Val	Ala	Leu	Glu	Gln	Pro	Tyr	Leu	Glu
	210						215					220				
20	Ile	Asn	Ser	Phe	Phe	Arg	Arg	Asn	Gly	Ser	Pro	Glu	Thr	Glu	Val	Gln
	225					230					235				240	
25	Ala	Met	Lys	Thr	Leu	Ser	Tyr	Phe	Asp	Ile	Met	Asn	Leu	Ala	Asp	Arg
					245					250					255	
30	Val	Lys	Val	Pro	Val	Leu	Met	Ser	Ile	Gly	Leu	Ile	Asp	Lys	Val	Thr
			260							265				270		
35	Pro	Pro	Ser	Thr	Val	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	His	Leu	Glu	Thr	Lys	Lys
			275					280					285			
40	Glu	Leu	Lys	Val	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Gly	His	Glu	Tyr	Ile	Pro	Ala	Phe
	290						295					300				
45	Gln	Thr	Glu	Lys	Leu	Ala	Phe	Phe	Lys	Gln	His	Leu	Lys	Gly		
	305					310					315					

45 <210> 2  
 <211> 957  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

50 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de CCA química 6633/168

55 <400> 2

	atgcaactat tcgatctgcc gctcgaccaa ttgcaaactg ataagcctga aaaaacaaca	60
60	ccgaacgatt tttctgagtt ttggaaatcg tctttggacg aacttgcgaa agtcaaagca	120
	gcacctgatt tacagctggt tgattatcct gctgatggag tcaaggtgta ccgcctcaca	180
65	tataaaagct tcggaaacgc ccgcattacc ggatggtacg cagtgcctga caaggaagga	240
	ccgcatccgg cgatcgtcaa atatcatggc tacaacgcta gctatgacgg tgagattcat	300

## ES 2 272 115 B1

	gaaatggtaa actgggcgct ccacggttac gccgcattcg gcatgctagt ccgcggccag	360
5	cagagcagcg aggatacagag tatttctcca catggccatg ctttgggctg gatgacgaaa	420
	ggaattcttg ataaagatac atactattac cgcggtgttt atttggacgc cgtccgcgcg	480
	cttgagggtca tcagcagctt cgacgaggtt gacgaaacaa ggatcgggtg gacaggagga	540
10	agccaaggcg gaggtttaac cattgccgca gcagcgctgt cagacattcc aaaagccgcg	600
	gttgccgatt atccttattt aagcaacttc gaacgggcca ttgatgtggc gcttgaacag	660
15	ccgtaccttg aatcaattc cttcttcaga agaaatggca gcccggaac agaagtgcag	720
	gcgatgaaga cactttcata tttcgatatt atgaatctcg ctgaccgagt gaaggtgcct	780
20	gtcctgatgt caatcggcct gattgacaag gtcacgccgc cgtccaccgt gtttgccgcc	840
	tacaatcatt tggaacaaa gaaagagctg aagggtgacc gctacttcgg acatgagtat	900
25	atccctgctt ttcaaactga aaaacttgct ttctttaagc agcatcttaa aggctga	957

<210> 3

<211> 35

30 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

35 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 3

40	gcggccgcat gcaactatc gatcggcgc tcgac	35
----	--------------------------------------	----

<210> 4

<211> 35

45 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

50 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 4

55	gcggccgctc agccttaag atgctgctta aagaa	35
----	---------------------------------------	----

<210> 5

<211> 42

60 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

65 <223> Oligonucleótido cebador

## ES 2 272 115 B1

<400> 5  
ggatgacgaa aggaattctt gataaagata cactactatta cc 42  
5  
<210> 6  
<211> 41  
<212> DNA  
10 <213> Artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleótido cebador  
15  
<400> 6  
gtatctttat caagaattcc ttcgctcgc cagcccaaag 41  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 272 115

② Nº de solicitud: 200400346

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.02.2004

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 9/86 (2006.01)  
C12N 15/55 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TAKIMOTO, A. et al. "High-level expression, purification, and some properties of a recombinant cephalosporin-C deacetylase.", J. BIOSCI. BIOENG., 1999, Vol. 87, No. 4, páginas 456-462. Todo el documento.	1-14
A	EP 0454478 A1 (SHIONOGI & CO. LTD.) 30.10.1991, todo el documento.	1-14
A	WO 9938982 A1 (BIOCHEMIE GESELLSCHAFT MBH) 05.08.1999, todo el documento.	1-14
A	VINCENT, F. et al. "Multifunctional xylooligosaccharide/ cephalosporin C deacetylase revealed by the hexameric structure of the Bacillus subtilis enzyme at 1.9A resolution.", J. MOL. BIOL., 2003, Vol. 330, No. 3, páginas 593-606.	1-14
A	MITSUSHIMA, K. et al. "Gene cloning, nucleotide sequence, and expression of a cephalosporin-C deacetylase from Bacillus subtilis.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 1995, Vol. 61, No. 6, páginas 2224-2229. Todo el documento.	1-14

#### 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 nº:

Fecha de realización del informe  
27.03.2007

Examinador  
J.L. Vizán Arroyo

Página  
1/1