



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 304 191**

② Número de solicitud: 200402857

⑤ Int. Cl.:
C12N 9/84 (2006.01)
C12P 37/06 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **26.11.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2008**

Fecha de la concesión: **13.10.2009**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
01.10.2009

④ Fecha de anuncio de la concesión: **29.10.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.10.2009

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Mata Riesco, Isabel de la;
Torres Bacete, Jesús;
Hormigo Cisneros, Daniel;
Stuart León, Maribel;
Arroyo Sánchez, Miguel;
Castillón Borreguero, María Pilar;
Acebal Sarabia, Carmen y
García López, José Luis**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para producir ácido-6-aminopenicilánico mediante la enzima aculeacina A acilasa de *Actinoplanes utahensis*, purificada a partir de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3377.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico mediante la enzima aculeacina A acilasa de *Actinoplanes utahensis*, purificada a partir de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3377. La invención comprende un procedimiento de producción del ácido 6-aminopenicilánico mediante la hidrólisis de las penicilinas V, K, F o dihidroF utilizando la enzima aculeacina A acilasa de la bacteria *Actinoplanes utahensis* purificada a partir de los caldos de cultivo de células de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3367 que portan el gen aac que codifica dicha enzima.

ES 2 304 191 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

ES 2 304 191 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico mediante la enzima aculeacina A acilasa de *Actinoplanes utahensis*, purificada a partir de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3377.

5

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología enzimática. Más concretamente en la obtención mediante métodos enzimáticos de ácido 6-aminopenicilánico, núcleo de los antibióticos β -lactámicos denominados penicilinas, utilizando como sustratos penicilinas naturales, y más concretamente a partir de penicilinas V, K, F y dihidro F.

10

Estado de la técnica

Las acilasas son enzimas ampliamente utilizadas en la producción industrial de antibióticos y antifúngicos semi-sintéticos.

15

En la producción de penicilinas semisintéticas el producto de partida es el ácido 6-aminopenicilánico (en lo sucesivo 6-APA) el cual es obtenido mediante la hidrólisis de la penicilina G con penicilina G acilasa (en lo sucesivo PGA) o de la penicilina V con penicilina V acilasa (en lo sucesivo PVA). Las penicilinas G y V se producen industrialmente mediante procesos fermentativos en los que también se sintetizan otras penicilinas alifáticas naturales (penicilinas K, F y dihidro F), las cuales representan alrededor del 1-2% de la penicilina total en los caldos. Las penicilina acilasas (PGAs o PVAs) utilizadas industrialmente no son capaces de hidrolizar estas penicilinas alifáticas cuya presencia dificulta la cristalización del 6-APA, implicando ambos hechos un menor rendimiento en la obtención del 6-APA, lo que ocasiona pérdidas económicas significativas. Actualmente la única penicilina acilasa descrita capaz de hidrolizar estas penicilinas alifáticas eficazmente es la PVA de *Streptomyces lavendulae* ATCC 13664 (Hamilton-Miller J.M.T. (1966) *Bacteriol. Rev.* 30, 761-771; Torres R. *et al.* (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 81-84; Torres-Guzmán R. *et al.* (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 291, 593-597.

20

25

Kleinschmidt W.J. *et al.* en 1964 describieron que la bacteria *Actinoplanes utahensis* ATCC 14539 era capaz de producir 6-APA mediante la hidrólisis de penicilinas producidas por células de hongos filamentosos del género *Penicillium* (US Patent 3150059). Sin embargo, la enzima o enzimas responsables de la hidrólisis y los genes que las codifican no fueron aislados ni caracterizados.

30

Posteriormente se ha utilizado *Actinoplanes utahensis* ATCC 14539 para la producción de antibióticos antifúngicos semisintéticos, donde lipopéptidos cíclicos (en lo sucesivo equinocandinas) son hidrolizados dando lugar a un hexapéptido cíclico, núcleo de partida para la obtención de nuevas equinocandinas semisintéticas con propiedades mejoradas (US Patent 4293482, EP0031221, US Patent 4482487, 4524135, Boeck, L.D. *et al.* (1988) *J. Antibiot.* 41, 1085-1092; Boeck, L.D. *et al.* (1989) *J. Antibiot.* 42, 382-388; Debono, M. (1989) *J. Antibiot.* 42, 389-397). En este proceso de hidrólisis de los lipopéptidos se utiliza la enzima aculeacina A acilasa (en lo sucesivo MC) que produce *A. utahensis*. Esta es una enzima extracelular que cataliza la hidrólisis de la aculeacina A y de otras equinocandinas relacionadas. La AAC de *A. utahensis* ha sido aislada, purificada y caracterizada (Takeshima H. *et al.* (1989) *J. Biochem.* 105, 606-610). Asimismo, el gen aac que codifica para la AAC de *A. utahensis* ha sido clonado, secuenciado y expresado en *Streptomyces spp.* (Inokoshi J. *et al.* (1992) *Gene* 119, 29-35; Inokoshi J. *et al.* (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 532-536). Se trata de una enzima heterodimérica, con una subunidad pequeña (en lo sucesivo subunidad α) de 19 kDa y una subunidad grande (en lo sucesivo subunidad β) de 55 kDa. Aunque su estructura se asemeja a la de las penicilina G acilasas y a la de las glutaril acilasas que hidrolizan derivados de los ácidos fenilacético y glutárico, respectivamente, la enzima no utiliza estos derivados como sustratos, por lo que parecía que la función de esta enzima estaba limitada a la hidrólisis de los lipopéptidos antes señalados y por lo tanto no se había descrito su actividad y utilidad para la hidrólisis de penicilinas.

35

40

45

50

Descripción de la invención

Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico mediante la enzima aculeacina A acilasa de *Actinoplanes utahensis*, purificada a partir de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3377.

55

Para la realización de esta invención se ha utilizado la bacteria Gram positiva *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052, que se corresponde con *Actinoplanes utahensis* ATCC 14539 como donador del ácido desoxirribonucleico (en lo sucesivo referido como ADN) productor de la enzima AAC.

60

En base a la secuencia conocida del gen aac que codifica la enzima AAC de *A. utahensis* se diseñaron oligonucleótidos sintéticos a fin de amplificar el gen aac mediante el proceso de amplificación conocido como reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo referido como PCR), utilizando como molde el ADN genómico de *A. utahensis* NRRL 12052. En estos oligonucleótidos sintéticos se incluyeron las secuencias de unión al ribosoma de *Escherichia coli* (RBS), ATG como codón de iniciación de la traducción, ya que está descrito GTG como codón de iniciación del gen aac de *A. utahensis*, y un codón de terminación de la traducción, así como distintos sitios de restricción útiles para posteriores clonaciones. Se obtuvo así un fragmento de ADN con la secuencia génica que codifica la AAC incluyendo la secuencia que codifica para el péptido señal, el cual fue clonado en un vector plasmídico bifuncional de *Escherichia*

65

coli y *Streptomyces lividans* que porta dos marcadores de resistencia a la ampicilina, para su selección en *E. coli*, y a la tioestreptona, para su selección en *S. lividans*.

Dicha construcción se comprobó mediante secuenciación y a continuación se llevó a cabo la transformación de la cepa *Streptomyces lividans* 1326. Se obtuvieron clones recombinantes que expresaban de forma constitutiva el gen aac bajo el control del promotor del gen de la eritromicina. Uno de dichos clones de *S. lividans* que contenía el vector plasmídico portador del gen aac y que producía la MC de *A. utahensis* se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia, España, con el nº 3377.

Para la producción de la MC utilizando el clon recombinante CECT 3377 previamente seleccionado, se cultivó el organismo en TSB (Tripton de soja, cloruro sódico, glucosa y fosfato bipotásico) a 30°C. El microorganismo recombinante se estabilizó mediante la adición de tioestreptona al medio de cultivo, antibiótico para el que confiere resistencia el vector que contiene el gen aac. La presencia del antibiótico, además de conferir estabilidad a la producción, evita la contaminación del medio de cultivo por otros microorganismos no deseados. La AAC producida por *S. lividans* CECT 3377 es extracelular, obteniéndose a partir del caldo de cultivo mediante separación de las células por centrifugación. El extracto libre de células presenta una AAC con grado de pureza elevado, pudiendo purificarse la enzima MC a homogeneidad mediante un procedimiento sencillo utilizando técnicas cromatográficas convencionales.

Una vez obtenida la MC pura se procedió a determinar su actividad frente a las penicilinas V, K, F y dihidro F, encontrándose que hidrolizaba dichos compuestos y determinándose los parámetros cinéticos de la enzima con cada uno de ellos.

La novedad de esta invención radica en el hecho de ser la primera vez que se describe la actividad penicilina acilasa de la enzima aculeacina A acilasa de *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 (ATCC 14539), descrita como hexaciclolipopeptidil acilasa, lo que proporciona valor añadido al empleo de esta enzima a escala industrial para su aplicación en la producción del ácido 6-aminopenicilánico a partir de la hidrólisis de penicilinas V, K, F o dihidro F, lo que tiene un gran valor industrial.

Breve descripción de las figuras

La invención se ilustra con la siguiente figura:

Figura 1. Obtención de 6-APA a partir de las penicilinas V, K, dihidro F y F mediante la MC producida por *S. lividans* CECT 3377, representada en μ moles de 6-APA por minuto y miligramo de enzima.

Figura 2. Purificación de la MC de *Actinoplanes utahensis* expresada en *Streptomyces lividans* CECT 3377. A) Cromatografía de intercambio catiónico en columna de S-Sepharose. B) Cromatografía de penetrabilidad en columna de Superose12. C) electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Calle 1, 10 μ g de proteína del pico I; calle 2, 10 μ g de proteína del pico II; calle P, proteínas patrón preteñidas.

Modo de realización de la invención

La presente invención será ilustrada con más detalle en los ejemplos que siguen:

Ejemplo 1

Determinación de la actividad penicilina V acilasa de los caldos de fermentación de Actinoplanes utahensis NRRL 12052 (ATCC 14539)

Actinoplanes utahensis NRRL 12052, que se corresponde con *Actinoplanes utahensis* ATCC 14539 se cultivó según lo descrito (Takeshima H. *et al.* (1989) J. Biochem. 105, 606-610). En los caldos de fermentación libres de células tras centrifugación se llevó a cabo la determinación de la actividad penicilina V acilasa utilizando penicilina V (30 mM) como sustrato, de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Torres *et al.* (1998) Progress in Biotechnology 15: Stability and Stabilization of Biocatalysts, A. Ballesteros, FJ Plou, JL Iborra and PI Hailing Eds., Elsevier, Amsterdam, pp 719-724). La incubación se lleva a cabo en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 8, durante 20 minutos a 40°C. La reacción se detiene añadiendo 400 μ l de acetato sódico 50 mM, pH 4,5 y, tras centrifugación, la liberación de 6-APA se valora espectrofotométricamente por reacción con *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) según las especificaciones de Balasingham K. *et al.* (1972) (Balasingham K. *et al.*(1972) Biochim.,Biophys. Acta 276, 250-256).

ES 2 304 191 B2

Ejemplo 2

Clonación mediante PCR del gen *aac*

5 1. Preparación del ADN de *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 (ATCC 14539)

La cepa de *A. utahensis* NRRL 12052 (ATCC 14539) se cultivó en medio YEME (extracto de levadura (0,3%), bactopectona (0,5%), extracto de malta (0,3%), glucosa (1%), MgCl₂ 5 mM), suplementado con sacarosa (34%) y glicina (0,5%). La incubación se realizó durante 18 horas a 300 r.p.m. y 30°C. Seguidamente, se recogió el micelio por centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos, se lavó con sacarosa al 10% y, a continuación, se procedió a la Tisis celular mediante tratamiento con lisozima. Por último, se purificó el ADN siguiendo un procedimiento previamente descrito (Hopwood D.A. *et al.* (1985) Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, England). Para conseguir una mayor pureza del ADN, éste se trató con ARNasa, se extrajo varias veces con fenol neutro y cloroformo–alcohol isoamílico 24:1 (CIA) y posteriormente se precipitó con isopropanol. Tras realizar lavados con etanol al 70% y etanol al 100%, el ADN se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM).

20 2. Preparación del vector bifuncional pEM4 y de las células competentes de *E. coli* para la clonación del gen *aac* de *Actinoplanes utahensis*

El vector plasmídico pEM4, bifuncional con origen de replicación en *E. coli* y en *S. lividans*, contiene marcadores de resistencia para ampicilina y tioestreptona, para su selección en *E. coli* y *S. lividans* respectivamente (Quirós L.M. *et al.* (1998) Mol. Microbiol. 28,1177-1186). Dicho vector se preparó de acuerdo con las condiciones descritas: las cepas de *E. coli*, que poseían individualmente el plásmido antes indicado, se incubaron durante 16 horas con agitación en un agitador orbital a 250 r.p.m. y a 37°C en 0,05 litros de medio LB (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, USA).. Transcurrido el tiempo las células se sedimentaron y los plásmidos se extrajeron y purificaron mediante el procedimiento High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) siguiendo el protocolo proporcionado por el suministrador.

La cepa utilizada para la clonación fue *E. coli* DH5 α . Para obtener las células competentes se utilizó el procedimiento del RbCI (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, USA).

35 3. Obtención mediante PCR del fragmento de ADN que contienen el gen *aac* de *A. utahensis*

A partir de las secuencias amino terminales conocidas (Inokoshi J. *et al.* (1992) Gene 119, 29-35) y teniendo en cuenta el uso de codones en *Streptomyces* se diseñaron los oligonucleótidos sintéticos descritos en SEQ ID NO: 1 y 2.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación mediante PCR se mezclaron 16 μ l (5 μ M) de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados con 0,5 μ g del ADN genómico de *A. utahensis*, obtenido como se describe en el apartado 1 del ejemplo 2. A la mezcla se le adicionaron 2,5 unidades de la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Promega) junto con el tampón adecuado recomendado por los suministradores. El volumen final de cada reacción fue de 0,1 ml conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%. El preparado se sometió a un proceso de amplificación en un termociclador Eppendorf Modelo Mastercycler Gradient en las siguientes condiciones: 96°C (2 minutos) a continuación 5 ciclos, siendo cada ciclo de 96°C (1 minuto), 70°C (2 minutos) y 72°C (8 minutos); a continuación otros 5 ciclos, siendo cada ciclo de 96°C (1 minuto), 68°C (2 minutos) y 72°C (8 minutos); 5 ciclos, siendo cada ciclo de 96°C (1 minuto), 63°C (2 minutos) y 72°C (8 minutos); y por último 20 ciclos, siendo cada ciclo de 96°C (1 minuto), 60°C (2 minutos) y 72°C (8 minutos). El resultado de la amplificación se visualizó mediante tinción de bromuro de etidio después de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

El fragmento de ADN obtenido por PCR con tamaño aproximado de 2,3 kb se purificó mediante extracción del gel de agarosa por GeneClean de Bio101 (Inc.) siguiendo el protocolo recomendado.

55 4. Clonación y secuenciación del fragmento obtenido por PCR que contiene el gen *aac*

1 μ g del fragmento purificado de ADN resultante del procedimiento de PCR se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI (Roche), puesto que los oligonucleótidos se diseñaron con dianas *Xba*I para el extremo 5' y *Eco*RI para el extremo 3'. Las digestiones se llevaron a cabo en un tampón recomendado por los suministradores y compatible para las dos enzimas, a 37°C durante tres horas, tras las cuales la reacción se detuvo calentando la mezcla durante 15 minutos a 85°C. El fragmento digerido se incubó con una muestra de 0,5 μ g de ADN del plásmido bifuncional pEM4 digerido con las enzimas *Xba*I y *Eco*RI en las mismas condiciones que el fragmento. El fragmento de ADN se ligó al ADN plasmídico mediante la enzima T4 ADN ligasa (USB) en presencia de ATP usando un tampón recomendado por los suministradores.

La mezcla de ligación resultante se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Los transformantes se seleccionaron en medio LB sólido al que se le había adicionado ampicilina (100 μ g/ml). Mediante este procedimiento se obtuvieron varios clones que se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados. Para ello, se crecieron las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas en medio LB líquido a 37°C

ES 2 304 191 B2

durante 16 horas y con agitación a 250 r.p.m., a continuación se extrajeron y purificaron los plásmidos mediante el procedimiento High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) siguiendo el protocolo proporcionado por el suministrador. Uno de estos clones que contenía el plásmido recombinante que porta el fragmento del gen aac se identificó como pAACAU.

5 El fragmento de ADN contenido en el plásmido pAACAU se secuenció por ambos extremos del fragmento mediante secuenciación automática en un equipo ABI PRISM 3700 en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El análisis de secuencia del plásmido constató que el fragmento de ADN clonado contenía el gen aac desde la secuencia
10 génica que codifica para el péptido señal hasta el codón de terminación de la traducción, la secuencia génica que codifica para el RBS de *E. coli* y ATG como codón de iniciación.

Ejemplo 3

15 *Producción de la AAC de A. utahensis en S. lividans*

1. Preparación de las células de *S. lividans* competentes para expresión del gen aac

20 La cepa utilizada para la clonación y expresión del fragmento de ADN que porta el gen aac fue *S. lividans* 1326. La obtención de células recombinantes se llevó a cabo mediante la transformación de protoplastos, los cuales se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito (Hopwood DA. *et al.* (1985) Genetic Manipulation of *S. lividans*. A laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, England).

25 2. Obtención de una cepa recombinante de *S. lividans* productora de la AAC de *A. utahensis*

El plásmido pAACAU (2 µg), purificado a partir de un cultivo puro de una cepa recombinante de *E. coli* DH5α, como ya se ha descrito anteriormente, se utilizó para transformar protoplastos de *S. lividans* 1326 siguiendo el método descrito (Hopwood DA. *et al.* (1985) Genetic Manipulation of *S. lividans*. A laboratory Manual. The John Innes Foundation,
30 Norwich, England). Los transformantes se sembraron en medio R2YE sólido y se incubaron a 30°C durante 24 horas, a continuación se adicionó tioestreptona (5 µg/ml) con el fin de seleccionar las células recombinantes que portan el plásmido pAACAU. Se obtuvieron numerosos clones que se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% de los plásmidos purificados, seleccionando uno de ellos al que se denominó *S. lividans* pAACAU y que se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el nº 3377.

35 3. Producción de la AAC de *A. utahensis* en *S. lividans* CECT 3377

La cepa *S. lividans* CECT 3377 se fermentó en medio TSB durante 140 horas a, 30°C y 250 r.p.m. Cada 24 horas se tomaron alícuotas de los caldos de cultivo y, tras centrifugación a 3000 x g durante 30 minutos a 4°C, se procedió a la determinación de la actividad MC tanto en el sobrenadante (extracto libre de células) como en el sedimento (extracto celular). En este último caso, se realizó una ruptura previa de las células por sonicación. El ensayo de actividad se llevó a cabo utilizando penicilina V como sustrato, tal y como se describe en el ejemplo 1. La actividad AAC solo fue detectada en el sobrenadante, donde el máximo se produce a las 96 horas de cultivo.

45 Ejemplo 4

Purificación de la AAC de A. utahensis expresada en S. lividans CECT 3377

50 La cepa *S. lividans* CECT 3377 se fermentó en 300 ml medio TSB durante 72 horas a 30°C y 250 r.p.m. de agitación. Seguidamente se centrifugaron los caldos de cultivo a 3000 x g durante 30 minutos a 4°C. Con el sobrenadante libre de células obtenido se procedió a la purificación de la MC. Para ello, los caldos de producción libres de células se ajustaron a pH 6 y se sometieron a una cromatografía de intercambio catiónico mediante su aplicación en una columna de S-Sepharose Fast Flow (2,6 x 28 cm) de Pharmacia, equilibrada en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6 y conectada a un sistema FPLC de Pharmacia. En estas condiciones la AAC quedó retenida en la columna y se eluyó mediante la aplicación de un gradiente discontinuo de 0 a 1,5 M de NaCl en el mismo tampón. Para ello, en primer lugar, la columna se eluyó con 150 ml de tampón con 0,75 M de NaCl, no eluyendo la enzima. A continuación la proteína se eluyó mediante la aplicación de 150 ml de un gradiente continuo de 0,75 a 1,5 M de NaCl en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6, seguido de una elución isocrática con 150 ml en el mismo tampón con NaCl 1,5 M. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente y con un flujo de elución de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 1,5 ml, eluyendo la enzima entre los 726 y 783 minutos (fracciones de la 484 a la 522, ambas inclusive, entre los 726 y 783 ml de elución), siendo la concentración de NaCl de aproximadamente 1M. En la figura 2A se representa la proteína obtenida por elución en la cromatografía de intercambio catiónico (mediante la medida de la absorbancia a 280 nm) con respecto al tiempo de elución en minutos (línea continua), así como el gradiente de NaCl utilizado (línea de puntos) y la actividad enzimática del conjunto de fracciones con actividad AAC en Unidades Internacionales por ml (UI/ml) (línea de rayas). El conjunto de fracciones con actividad AAC se concentraron en un lecho de polietilenglicol 35.000 (Fluka) y se sometieron a una cromatografía de penetrabilidad en Superose12 Fast Flow (1 x 30 cm) de Pharmacia, equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7 y conectada a un sistema FPLC de Pharmacia. Al

igual que la cromatografía anterior, ésta se llevó a cabo a temperatura ambiente, con un flujo de elución de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml. La enzima eluye en dos picos de proteína que coinciden con dos picos de actividad penicilina acilasa, eluyendo el primer pico entre los minutos 22 y 36 (11 y 28 ml de elución) y el segundo pico entre los minutos 37 y 48 (18,5 y 24 ml de elución). En la figura 2B se representa la concentración de proteína eluida (línea continua) y los dos picos de actividad penicilina acilasa, I y II, (línea de puntos) frente al tiempo de elución. La figura 2C muestra el análisis de ambos picos por electroforesis en SDS-PAGE donde se observó que en los dos picos está presente la aculeacina A acilasa, detectándose en los dos picos las dos subunidades de la proteína (α y β). Tras este último paso cromatográfico la AAC se obtuvo pura a homogeneidad.

10 Ejemplo 5

Determinación y caracterización de la actividad penicilina acilasa de la AAC de A. utahensis producida por S. lividans CECT 3377 sobre las penicilinas V, K, F y dihidro F

15 La AAC pura se caracterizó funcionalmente determinando la estabilidad y actividad de la enzima frente a pH, temperatura y fuerza iónica, utilizando penicilina V (30 mM) como sustrato. La liberación del 6-APA tras la reacción se valoró espectrofotométricamente por reacción con fluorescamina (método de la fluorescamina) según las especificaciones de Udenfriend *et al.* (1972) modificado por Reyes *et al.* (1989) (Udenfriend *S. et al.* (1972) Science, 178, 871-872; Reyes. F. *et al.* (1989) J. Pharma. Pharmacol., 41, 136-137).

20 Respecto a la temperatura, la enzima es estable hasta 50°C, presentando un máximo de actividad a 75°C. En cuanto al pH, la enzima es estable entre pH 6 y 10, siendo 8.2 su pH óptimo. Las condiciones óptimas de reacción han quedado establecidas en pH 8.2 y 45°C de temperatura. Tras determinar las condiciones óptimas de actividad de la AAC producida por *S. lividans* CECT 3377, se caracterizó la capacidad de la enzima para producir 6-APA a partir de las penicilinas V, K, F y dihidro F, determinando los parámetros cinéticos de la enzima para cada una de las penicilinas. Para ello se llevaron a cabo ensayos de actividad utilizando como sustrato penicilina V, penicilina K, penicilina F o penicilina dihidro F a diferentes concentraciones en tampón fosfato potásico 100 mM pH 8,2 durante 20 minutos a 45°C, de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1. La liberación de 6-APA se valoró espectrofotométricamente por el método de la fluorescamina descrito en este ejemplo. Como se describe en la figura 1, la AAC clonada y expresada en *S. lividans* es capaz de generar 6-APA a partir de penicilinas V, K, F y dihidro F, quedando recogidos en la tabla 1 los parámetros cinéticos de la enzima para cada una de las penicilinas. Como se puede comprobar en dicha tabla, la MC de *A. utahensis* producida por *S. lividans* CECT 3377, presenta mayor eficacia catalítica frente a la penicilina K.

35 TABLA 1

Parámetros cinéticos de la AAC de A. utahensis producida por S. lividans CECT 3377 frente a diferentes penicilinas

Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Penicilina V	15,44	70,27	4,55
Penicilina K	0,95	33,26	34,80
Penicilina dihidroF	5,62	4,24	0,75
Penicilina F	11,45	1,13	0,1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicilina utilizando la enzima aculeacina A acilasa de *Actinoplanes utahensis* purificada a partir de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3377, **caracterizado** por las siguientes operaciones:

- 10 a) Cultivar células de la bacteria recombinante *Streptomyces lividans* CECT 3377 productoras de aculeacina A acilasa en medio definido TSB, durante al menos 96 horas a 30°C y 250 r.p.m. de agitación.
- 15 b) Obtener caldos de producción libres de células mediante centrifugación a 3000 x g durante 30 minutos a 4°C y ajustarlos a pH 6.
- c) Someter los caldos ajustados a una cromatografía de intercambio catiónico mediante su aplicación en una columna S-Sepharose equilibrada en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6 y eluir la enzima retenida mediante un gradiente discontinuo de 0 a 1,5 M de NaCl en el mismo tampón.
- 20 d) Concentrar en lecho de polietilenglicol 35.000 el conjunto de fracciones con actividad aculeacina A acilasa.
- e) Someter el conjunto de fracciones con actividad aculeacina A acilasa concentrado a una cromatografía de penetrabilidad mediante su aplicación en una columna Superose12 y aislar las fracciones más activas.
- 25 f) Incubarlas fracciones más activas de la enzima aculeacina A acilasa con penicilina en tampón fosfato potásico 100 mM pH 8,2 durante 20 minutos a 45°C y deteniendo la reacción mediante la adición de acetato sódico a pH 4,5.

30 2. Procedimiento según la reivindicación 1 en que las fracciones más activas de la enzima aculeacina A acilasa eluyen entre los minutos 726 y 783 mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna de S-Sepharose y, posteriormente, en dos picos entre los minutos 22 y 48 en cromatografía de penetrabilidad en columna de Superose12.

3. Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 2, a partir de penicilina V.

4. Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 2, a partir de penicilina K.

35 5. Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 2, a partir de penicilina H.

6. Procedimiento para producir ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 2, a partir de penicilina dihidro F.

40 7. Cultivo biológicamente puro de la cepa *Streptomyces lividans* GECT 3377 que contiene el gen aac de *Actinoplanes utahensis*, que codifica la enzima aculeacina A acilasa, para producir ácido 6-amino penicilánico a partir de penicilina.

45

50

55

60

65

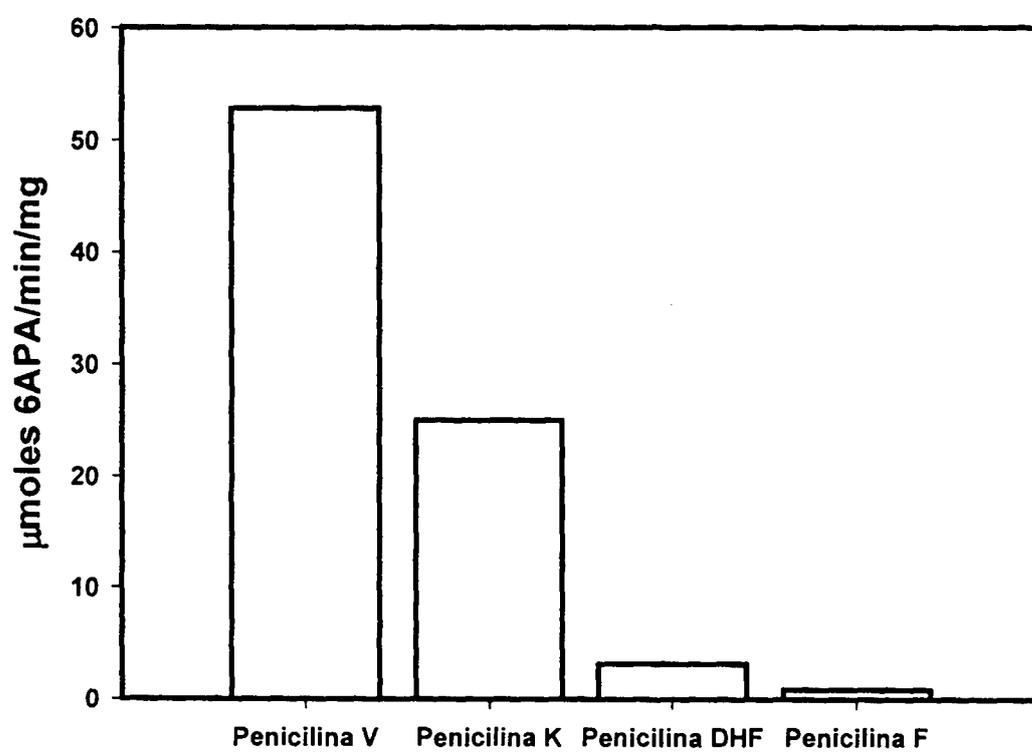


Figura 1

Figura 2A

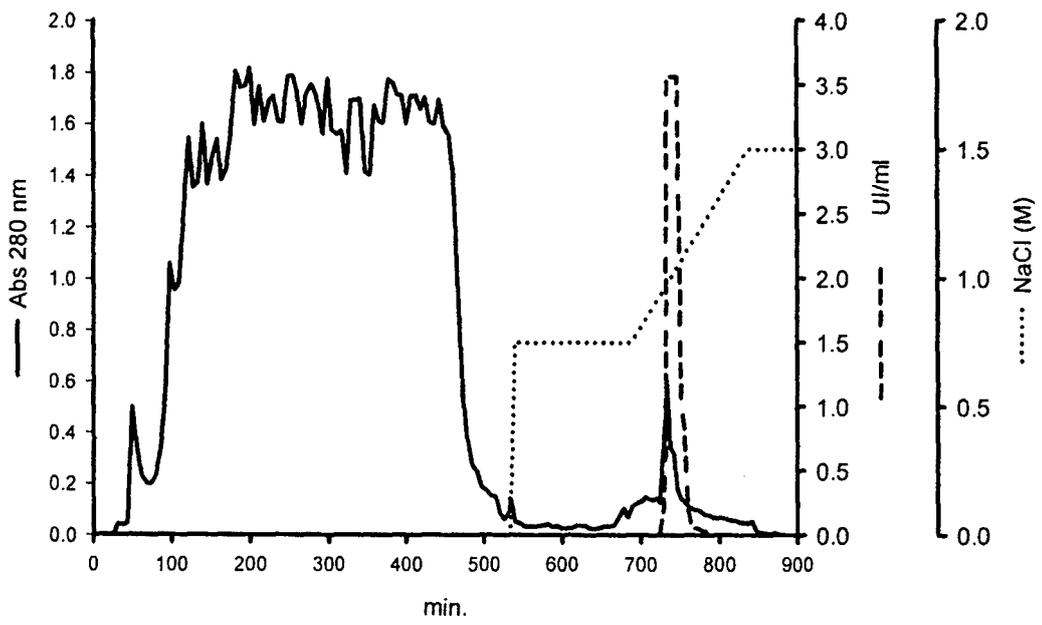


Figura 2B

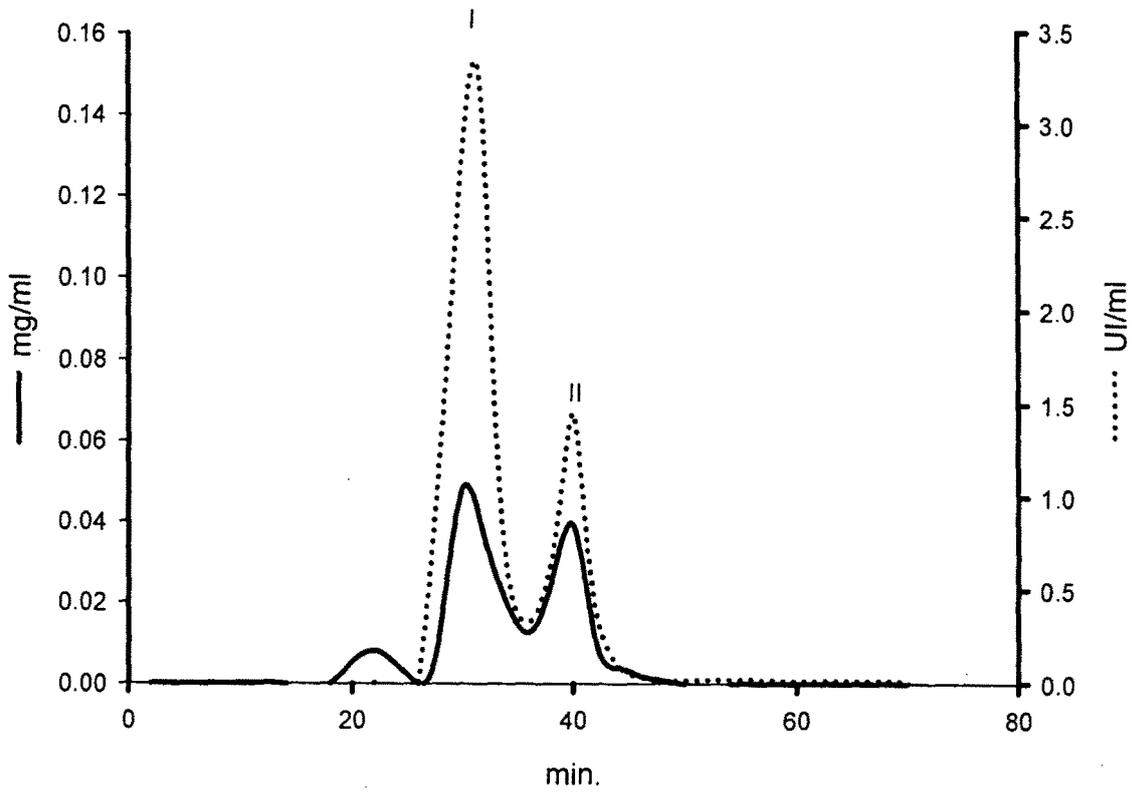
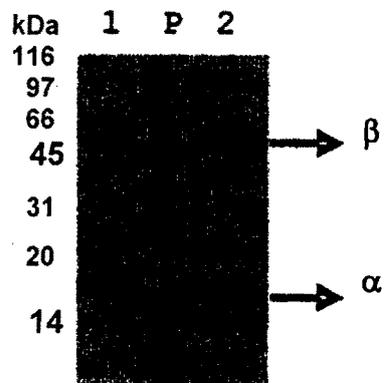


Figura 2C





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 191

② Nº de solicitud: 200402857

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 9/84** (2006.01)
C12P 37/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PARMAR A. et al. "Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA)". <i>Biotechnology Advances</i> 2000. Vol. 18, páginas 289-301.	1-6
A	INOKOSHI J. et al. "Efficient production of aculeacin-A acylase in recombinant streptomyces strains". <i>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY</i> . JUL 1993. Vol. 39, Nº. 4-5, páginas 532-536.	1-6
A	INOKOSHI J. et al. "Identification of precursor peptide of aculeacin A acylase as a protein with proteolytic activity". <i>FEMS MICROBIOLOGY LETTERS</i> . 15.12.1993. Vol. 114, Nº. 3, páginas 305-309.	1-6
A	KREUZMAN AJ. et al. "Membrane-associated echinocndin B deacylase of <i>Actinoplanes utahensis</i> : purification, characterization, heterologous cloning and enzymatic deacylation reaction". <i>JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY</i> . MAR. 2000.	1-6
A	ES 2105989 A1 (ANTIBIOTICOS S.A.) 16.10.1997	1-6

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
29.08.2008

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/1