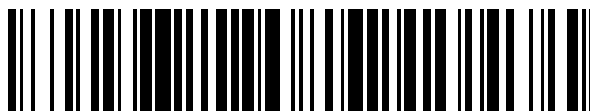


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 043**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2009 E 09781466 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2310488**

54 Título: **Cepas que producen adipoil-7-ADCA**

30 Prioridad:

**05.08.2008 EP 08161831**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.02.2013**

73 Titular/es:

**DSM SINOCHEM PHARMACEUTICALS  
NETHERLANDS B.V. (100.0%)  
Alexander Fleminglaan 1  
2613 AX Delft , NL**

72 Inventor/es:

**KOEKMAN, BERTUS, PIETER;  
BERG, VAN DEN, MARCO, ALEXANDER y  
BOVENBERG, ROELOF, ARY, LANS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 396 043 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Cepas que producen adipoil-7-ADCA

Campo del invento

- 5 El presente invento se refiere a unas cepas microbianas capaces de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N cuando se cultivan en un medio de cultivo que comprende ácido adípico.

Antecedentes del invento

- 10 Los antibióticos semisintéticos de  $\beta$ -lactamas (SSA's) se producen a una escala industrial partiendo de diversos compuestos intermedios de  $\beta$ -lactamas tales como el ácido 6-amino-penicilánico (6-APA), el ácido 7-amino-desacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA), el ácido 7-amino-cefalosporánico (7-ACA) y un 7-amino-3-cloro-3-cefemo-4-carboxilato (7-ACCA), un 7-amino-3-[(Z/E)-1-propen-1-il]-3-cefemo-4-carboxilato (7-PACA), el ácido 7-amino-desacetil-cefalosporánico (7-ADAC), el ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefemo-4-carboxílico (7-ACCCA) y otros.

- 15 El producto 7-ADCA de la primera generación se derivaba de la penicilina G (PenG) realizándose que tanto la expansión del anillo de penemo de 5 miembros para formar el anillo de cefemo de 6 miembros y la subsiguiente disociación de la cadena lateral de ácido fenilacético del fenilacetil-7-ADCA se llevaban a cabo usando reacciones químicas. El producto 7-ADCA de la siguiente generación se obtenía todavía partiendo de la PenG pero, después de la expansión química del anillo, la cadena lateral de ácido fenilacético del fenilacetil-7-ADCA era disociada  
20 enzimáticamente usando una apropiada (penicilin) acilasa. Se han desarrollado otros procedimientos en los que también la expansión del anillo de PenG para formar el fenilacetil-7-ADCA se lleva a cabo in vitro usando una apropiada enzima expandasa, pero estos procedimientos tienen poca importancia industrial.

- El procedimiento más elegante de producción para el 7-ADCA comprende la cultivación de un *Penicillium chrysogenum* transformado con, y que expresa, un gen que codifica una apropiada expandasa. Esta cepa de  
25 *Penicillium chrysogenum* tratada, cuando crece en la presencia de ácido adípico como el compuesto precursor de cadena lateral en el recipiente de fermentación, produce y excreta adipoil-7-ADCA - véanse el documento de solicitud de patente internacional WO93/05158. y la cita de Crawford y colaboradores (Bio/(Technol. 1995) 13, 58-62) o, para la expresión en *Cephalosporium acremonium*, la cita de Gutiérrez y colaboradores (Mol. Gen. Genetics (1991) 225, 56-64). En este procedimiento de producción, el adipoil-7-ADCA es recuperado a partir del caldo de fermentación, sometido a una apropiada acilasa para disociar la cadena lateral de ácido adípico, después de lo cual el 7-ADCA así obtenido es purificado, cristalizado y secado ulteriormente. Otros apropiados compuestos precursores de cadenas laterales han sido descritos en el documento WO95/04148 (el ácido 2-(carboxietiltio)acético y el ácido 3-(carboximetiltio)-propiónico), en el documento WO95/04149 (el ácido 2-(carboxietiltio)propiónico), en el documento WO96/38580 (el ácido fenil-acético) y en los documentos WO98/048034 y WO98/048035 (diversos ácidos dicarboxílicos). La expandasa cataliza la expansión del anillo de 5-miembros de los diversos ácidos penicilánicos acilados en N, proporcionando de esta manera los correspondientes ácidos desacetoxi-cefalosporánicos acilados en N.  
35

- Sin embargo, además de ser usado como el compuesto precursor de cadena lateral, un adipato puede ser degradado y usado como una fuente de carbono en el metabolismo primario del organismo capaz de producir el  
40 compuesto de N-adipoil  $\beta$ -lactama. Esto fue demostrado por ejemplo por Robin y colaboradores (Appl. Microbiol. Biotechnol. (2001) 57, 357-362)) en cultivos discontinuos con sacarosa como la fuente primaria de carbono. Después del agotamiento de la glucosa y la fructosa (derivadas de la sacarosa), comenzaba la formación de adipoil-6-APA y adipoil-7-ADCA en esta etapa solamente se incorporaba hasta un 2 % del ácido adípico en los compuestos de  $\beta$ -lactama, mientras que el resto se usaba como una fuente de carbono. Se sugirió por los autores que, debido a la similitud entre el ácido adípico y ciertos ácidos grasos, era probable que la degradación de ácido adípico se produjese por oxidación en posición  $\beta$ . En un estudio posterior Thykaer y colaboradores (Metabolic Engineering (2002), 4, 151-158), sobre la base de un análisis de la red metabólica de una cepa de *Penicillium chrysogenum* productora de adipoil-7-ADCA, llegaron a la conclusión de que la degradación del adipato tiene lugar en los microcuerpos (glioxisomas) por enzimas de oxidación en posición  $\beta$  y no en el citosol ni en los mitocondrios.  
45

- La naturaleza de la ruta de oxidación en posición  $\beta$  en hongos (filamentosos) y levaduras en general y en *Penicillium chrysogenum* en particular, todavía es oscura en lo que se refiere a la localización intracelular, las enzimas implicadas, así como el cometido de la ruta de oxidación en posición  $\beta$  en el metabolismo total del microorganismo. Con el fin de reducir la degradación del ácido adípico, ha sido sugerido por Thykaer y colaboradores (2002) suprimir la enzima responsable de la degradación del adipato, pero sin especificar que ninguna de dichas enzimas sea un  
55 candidato apropiado.

Puesto que un adipato es costoso en comparación con la glucosa o el glicerol, es indeseable la degradación del adipato durante la producción del compuesto N-adipoil β-lactama. En vez de ello, desde un punto de vista de procesos de producción a escala industrial, es muy deseable un rendimiento de incorporación cercano al 100 %.

#### Descripción detallada del invento

5 La divulgación proporciona una cepa microbiana mutante derivada de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de β-lactama adipoilada en N, cuando se cultiva en un medio que comprende ácido adípico, caracterizada porque la cepa microbiana mutante tiene un rendimiento mejorado de incorporación del ácido adípico desde el medio de cultivo dentro del compuesto de β-lactama adipoilada en N. El rendimiento de incorporación es  
10 definido aquí como el porcentaje molar de ácido adípico incorporado en el compuesto de β-lactama adipoilada en N en relación con la cantidad molar total de ácido adípico consumido. La cantidad molar total de ácido adípico consumido es igual a la cantidad molar total de ácido adípico añadido al proceso de fermentación menos la cantidad molar de ácido adípico que queda después del proceso de fermentación. Esto puede ser ilustrado por el siguiente ejemplo: cuando en un proceso de fermentación discontinuo, mientras que se cultiva un microorganismo capaz de producir un compuesto de β-lactama adipoilada en N, la concentración inicial de adipato en el medio es de 50 mM y al final de la fermentación se forman 10 mM del compuesto de β-lactama adipoilada en N y quedan en el medio de fermentación 15 mM de adipato, entonces el rendimiento de incorporación asciende a:  $10/(50-15)*100 = 29 \%$ . Similarmente, cuando se forman 40 mM del compuesto de β-lactama adipoilada en N y no queda adipato en el medio de fermentación, el rendimiento de incorporación asciende a  $40/50*100 = 80 \%$ .

20 El rendimiento mejorado de incorporación puede ser expresado como la mejoría relativa si la cepa microbiana mutante comparada con la cepa microbiana parental. Por ejemplo, cuando la cepa microbiana parental tiene un rendimiento de incorporación de 5 %, como más arriba se ha definido, y la cepa microbiana mutante tiene uno de 6 %, entonces el rendimiento mejorado de incorporación de la mutante es de 20 % ( $6/5*100 - 100$ ).

25 De manera preferible, la cepa mutante de la divulgación tiene un rendimiento mejorado de incorporación de por lo menos 5 %, más preferiblemente de por lo menos 7,5 %, más preferiblemente de por lo menos 10 %, más preferiblemente de por lo menos 15 %, más preferiblemente de por lo menos 20 %, más preferiblemente de por lo menos 30 %, más preferiblemente de por lo menos 40 %, más preferiblemente de por lo menos 50 %, más preferiblemente de por lo menos 60 %, más preferiblemente de por lo menos 70 %, más preferiblemente de por lo menos 80 %, más preferiblemente de por lo menos 90 %, más preferiblemente de por lo menos 95 %, más  
30 preferiblemente de por lo menos 97 %, más preferiblemente de por lo menos 98 %, más preferiblemente de por lo menos 99 %, y lo más preferiblemente de por lo menos 100 %.

35 El rendimiento mejorado de incorporación máxima que se puede obtener es dependiente del rendimiento real de incorporación de la cepa microbiana parental. Cuando la cepa microbiana parental tiene un rendimiento de incorporación de 5 % y un 100 % es el rendimiento teórico de incorporación máxima, entonces la cepa microbiana mutante puede tener un rendimiento mejorado de incorporación máxima de 1.900 % ( $100/5*100 - 100$ ). Similarmente, cuando la cepa microbiana parental ya tiene un rendimiento de incorporación de 50 % y un 100 % es el rendimiento teórico de incorporación máxima, entonces la cepa microbiana mutante puede tener un rendimiento mejorado de incorporación máxima de 100 % ( $100/50*100 - 100$ ).

40 El compuesto de β-lactama adipoilada en N, producido por la cepa microbiana, puede ser cualquier β-lactama adipoilada en N en la que el resto de β-lactama es un penemo o cefemo. Unos preferidos compuestos de β-lactama adipoilada en N son derivados de adipoilo de los compuestos intermedios antes enumerados: ácido 6-amino-penicilánico (6-APA), ácido 7-amino-desacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA), ácido 7-amino-cefalosporánico (7-ACA) y un 7-amino-3-cloro-3-cefemo-4-carboxilato (7-ACCA), un 7-amino-3-[(Z/E)-1-propen-1-il]-3-cefemo-4-carboxilato (7-PACA), ácido 7-amino-desacetil-cefalosporánico (7-ADAC), ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefemo-4-  
45 carboxílico (7-ACCCA) y otros. Son sumamente preferidas las cefalosporinas adipoiladas en N, y es sumamente preferido el adipoil-7-ADCA.

50 La cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de β-lactama adipoilada en N se puede ser seleccionar entre el conjunto que consiste en un hongo, una bacteria o una levadura. Preferiblemente, la cepa microbiana de la presente divulgación es un hongo, más preferiblemente un hongo filamentoso. Un hongo filamentoso preferido se puede seleccionar entre el conjunto que consiste en *Aspergillus*, *Acremonium*, *Trichoderma* y *Penicillium*. Más preferiblemente, la cepa microbiana mutante de la presente divulgación pertenece a la especie *Penicillium*, de manera sumamente preferible a *Penicillium chrysogenum*. Una bacteria preferida se puede seleccionar entre los conjuntos que consisten en *Streptomyces*, *Nocardia* o *Flavobacterium*.

55 En una forma preferida de realización, la cepa microbiana mutante de la presente divulgación se puede derivar de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de β-lactama adipoilada en N, pertenece a la especie *Penicillium*, de manera sumamente preferible es *Penicillium chrysogenum*, que ha sido transformada con un gen que codifica una expandasa, preferiblemente el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, que hace posible que la cepa produzca adipoil-7-ADCA cuando se cultive en la presencia del ácido adípico precursor.

En otra forma de realización, la cepa microbiana mutante de la presente divulgación se puede derivar de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N y pertenece a la especie *Penicillium*, de manera sumamente preferible es *Penicillium chrysogenum*, y además de con un gen de expandasa, preferiblemente el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, ha sido transformada con un gen de hidroxilasa, preferiblemente el gen *cefF* de *Streptomyces clavuligerus*, cuyo producto de expresión convierte a la cadena lateral 3-metilo del adipoil-7-ADCA en 3-hidroximetilo, para dar el ácido adipoil-7-amino-desacetil-cefalosporánico (adipoil-7-ADAC).

En otra forma de realización, la cepa microbiana mutante de la presente divulgación se puede derivar de una cepa microbiana parental capaz de producir el compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N y pertenece a la especie *Penicillium*, de manera sumamente preferible es *Penicillium chrysogenum*, y ha sido transformada con un gen de expandasa/hidroxilasa, preferiblemente el gen *cefEF* de *Acremonium chrysogenum*, cuyo producto de expresión convierte a la cadena lateral 3-metilo del adipoil-7-ADCA en 3-hidroximetilo, para dar el ácido adipoil-7-amino-desacetil-cefalosporánico (adipoil-7-ADAC).

En otra forma de realización, la cepa microbiana mutante de la presente divulgación se puede derivar de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N y pertenece a la especie *Penicillium*, de manera sumamente preferible es *Penicillium chrysogenum*, y además de con los genes que codifican una expandasa, preferiblemente el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, y una hidroxilasa, preferiblemente el gen *gebcefF* de *Streptomyces clavuligerus*, es transformada ulteriormente con un gen de acetiltransferasa, preferiblemente el gen *cefG* de *Streptomyces clavuligerus*, cuyo producto de expresión (es decir la aciltransferasa), convierte a la cadena lateral 3-hidroximetilo en la cadena lateral 3-acetiloximetilo para dar el adipoil-7-ACA.

En una forma de realización adicional, la cepa microbiana mutante de la presente divulgación se puede derivar de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N y pertenece a la especie *Penicillium*, de manera sumamente preferible es *Penicillium chrysogenum* y ha sido transformada con unos genes que codifican una expandasa, preferiblemente el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, una hidroxilasa, preferiblemente el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, y una enzima O-carbamoil transferasa, preferiblemente el gen *cmcH* de *Streptomyces clavuligerus*, dando como resultado el ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefemo-4-carboxílico (7-ACCCA).

Por lo tanto, el invento proporciona un método para la construcción y el aislamiento de una cepa microbiana mutante capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N, cuando se cultiva en un medio que comprende ácido adípico con un rendimiento mejorado de incorporación del ácido adípico desde el medio de cultivo dentro del compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N. Generalmente, el método del invento puede comprender las siguientes etapas:

a. Obtener la cepa microbiana parental en una forma que es apropiada para el método del invento. Unas formas apropiadas pueden ser las de conidiosporas, células vegetativas (por ejemplo un micelio fúngico), protoplastos y otras. La obtención de estas formas se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la especialidad.

b. Opcionalmente someter a la población obtenida en la etapa a) a condiciones mutagenizantes con el fin de mejorar la frecuencia de las mutaciones de ADN dentro de la población. Esta etapa es opcional puesto que también se puede usar la población no mutagenizada obtenida y aprovechar las mutaciones naturales presentes en la población y que aparecen como resultado de variaciones naturales de secuencias. Se puede aprovechar cualquier apropiada condición mutagenizante conocida en la especialidad, es decir una exposición a agentes mutágenos apropiados tales como luz UV (ultravioleta) lejana y agentes mutágenos químicos tales como nitrosoguanidina. Preferiblemente, el tratamiento con un agente mutágeno da como resultado una supervivencia comprendida entre 10 y 50 % para mutágenos químicos y entre 0,1 y 1 % para mutágenos físicos tales como luz UV lejana.

c. Opcionalmente enriquecer la población obtenida en la etapa a) o en la etapa b) con unos mutantes que tienen un rendimiento mejorado de incorporación de ácido adípico desde el medio de cultivo dentro del compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N. Unas apropiadas técnicas de enriquecimiento son las de:

- Selección usando compuestos análogos tóxicos (es decir compuestos análogos fluorados de ácido adípico); y/o
- Separación de conidiosporas no germinadas (o células que no crecen) a partir de células vegetativas y/o
- Aniquilación selectiva de células, por ejemplo células fúngicas vegetativas con pentaclorofenol.

Dos o más de estas técnicas de enriquecimiento se pueden combinar también con el fin de aumentar el nivel de enriquecimiento. Un método del invento comprende las siguientes etapas:

- a. Obtener conidiosporas de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N.
- b. Opcionalmente someter a las conidiosporas obtenidas en la etapa a) a condiciones mutagenizantes
- c. Cultivar las conidiosporas obtenidas en la etapa a) o en la etapa b) en un medio que contiene ácido adípico como la fuente principal de carbono, con lo que las esporas que son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono germinarán, crecerán y formarán un micelio
- d. Separar el micelio con respecto de las conidiosporas remanentes
- e. Repetir opcionalmente las etapas b) y c) y d) una o más veces

- f. Inocular las conidiosporas procedentes de la etapa d) en un medio que contiene una apropiada fuente de carbono para permitir el crecimiento de colonias individuales.
- g. Replicar las colonias que crecen, procedentes de la etapa f). en un medio que contiene una cantidad apropiada de ácido adípico para permitir la identificación de colonias que no crecen o que crecen más lentamente.
- h. Seleccionar las colonias que crecen en la etapa f) y las que pertenecen a las colonias que no crecen o que crecen más lentamente de la etapa g).

Acerca de la etapa a - Unas cepas microbianas parentales apropiadas capaces de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N han sido enumeradas en el primer aspecto del invento. La obtención de conidiosporas de la cepa microbiana parental.

Acerca de la etapa b - El sometimiento de las conidiosporas a unas condiciones mutagenizantes puede comprender un tratamiento con un agente mutágeno apropiado y se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la especialidad. Unos agentes mutágenos apropiados son luz UV lejana y agentes mutágenos químicos tales como nitrosoguanidina. Preferiblemente, el tratamiento con un agente mutágeno da como resultado una supervivencia de conidiosporas entre 10 y 50 % para agentes mutágenos químicos y entre 0,1 y 1 % para agentes mutágenos físicos tales como luz UV lejana.

Acerca de la etapa c - La cultivación de las conidiosporas obtenidas en la etapa a) o en la etapa b) en un medio que contiene ácido adípico como la principal fuente de carbono con lo que las esporas que son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono germinarán, crecerán y formarán un micelio, se puede llevar a cabo por métodos conocidos en la especialidad. Se puede añadir ácido adípico al medio como el ácido o en la forma de una sal, tal como la sal de sodio. Unas concentraciones apropiadas de ácido adípico están situadas entre 5 y 100 g/l, más preferiblemente de 50 - 80 g/l.

Acerca de la etapa d - Las conidiosporas que han germinado y han crecido para formar un micelio pueden tener retenida la capacidad de usar ácido adípico como una fuente de carbono. Las conidiosporas que no han germinado y no han crecido para formar un micelio pueden tener una capacidad reducida o completamente perdida de usar ácido adípico como una fuente de carbono. Estas conidiosporas pueden ser separadas con respecto del micelio usando métodos conocidos en la especialidad. Un método apropiado consiste en separar las conidiosporas con respecto del micelio por una técnica apropiada de filtración, tal como con un filtro Miracloth.

Acerca de la etapa e - El enriquecimiento de conidiosporas que tienen una capacidad reducida o completamente perdida de usar ácido adípico como una fuente de carbono se puede llevar a cabo repitiendo las etapas a-c, o repitiendo las etapas b-c.

Acerca de la etapa f - La inoculación de las conidiosporas procedentes de la etapa c) en un medio que contiene una apropiada fuente de carbono para permitir el crecimiento de colonias individuales se puede llevar a cabo en un medio apropiado tal como un medio sólido, p.ej. que contiene un agar, de acuerdo con métodos conocidos en la especialidad. La germinación de las conidiosporas y el crecimiento dentro de colonias individuales se pueden llevar a cabo en unas condiciones (con respecto, por ejemplo a la T, al pH, a la composición del medio y a las fuentes de carbono) que son apropiadas para las respectivas conidiosporas usadas en el método del invento.

Acerca de la etapa g - La siembra en placas de réplicas de las colonias obtenidas en la etapa f) con un método de replicación apropiado (por ejemplo un entresacado robótico de colonias y una re-inoculación) en un medio que contiene ácido adípico como la fuente principal de carbono, con lo que las colonias que son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono crecerán con una cierta velocidad de crecimiento y las que no son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono crecerán más lentamente o no crecerán en absoluto. El uso de ácido adípico como la fuente principal de carbono con lo que las colonias que son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono crecerán con una cierta velocidad de crecimiento y las que no son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono crecerán más lentamente o no crecerán en absoluto. Se pueden añadir ácido adípico al medio como el ácido o la forma de una sal, tal como la sal de sodio. Unas concentraciones apropiadas de ácido adípico están situadas entre 5 y 100 g/l, más preferiblemente son de 50 - 80 g/l.

Acerca de la etapa h - Seleccionar las colonias que crecen en la etapa f) y las que pertenecen a las colonias que no crecen o que crecen más lentamente de la etapa g).

Las cepas microbianas mutantes seleccionadas en la etapa h pueden ser ensayadas en cuanto a su incorporación de ácido adípico en el compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N, cuando se cultivan en un medio que comprende ácido adípico. Solamente se seleccionan las cepas microbianas mutantes que tienen un rendimiento mejorado de incorporación de por lo menos 30 %, mas preferiblemente de por lo menos 40 %, mas preferiblemente de por lo menos 50 %, mas preferiblemente de por lo menos 60 %, mas preferiblemente de por lo menos 70 %, mas preferiblemente de por lo menos 80 %, mas preferiblemente de por lo menos 90 %, mas preferiblemente de por lo menos 95 %, mas preferiblemente de por lo menos 97 %, mas preferiblemente de por lo menos 98 %, mas preferiblemente de por lo menos 99 %, y lo mas preferiblemente de por lo menos 100 %, en donde el rendimiento de incorporación es como se ha definido anteriormente.

Las cepas microbianas mutantes seleccionadas en la etapa h pueden opcionalmente ser ensayadas en cuanto a su capacidad reducida o completamente perdida de usar ácido adípico como una fuente de carbono, por medición de su crecimiento en un medio apropiado o bien con ácido adípico o con uno o más azúcares como la única fuente de carbono.

## Materiales y métodos

Las concentraciones de adipoil-7-ADCA se determinaron usando una HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) como se ha descrito con detalle en el documento WO98/48035.

## EJEMPLOS

5 **Ejemplo 1**

La cepa de *Penicillium chrysogenum*, depositada el 2 de Junio de 1995 en la Centraal Bureau voor Schimmelcultures (Oficina central de cultivos de hongos) bajo el número CBS 455.95 fue transformada con el gen *cefE* que codifica la expandasa procedente de *Streptomyces clavuligerus*, como se describe con detalle en el documento WO93/05158.

10 Para la selección de un medio de crecimiento destinado a la detección de cepas mutantes de *Penicillium chrysogenum* que producen adipoil-7-ADCA con una incorporación mejorada de ácido adípico desde el medio dentro del adipoil-7-ADCA, unas esporas de la cepa parental de *Penicillium chrysogenum* que produce el adipoil-7-ADCA fueron inoculadas sobre unas placas de agar que contenían un medio tal como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO98/373179, que tiene la siguiente composición (en g/l): urea, 4,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,1; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,9; 15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O, 4,8 y 10 ml/l de una solución de elementos traza (que contienen en g/l: ácido cítrico, H<sub>2</sub>O, 150; FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 15; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 150; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,0075; CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 0,24; CoSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,375; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,5; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2,28; CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,99) - pH antes de la esterilización 6,5.

El medio fue suplementado con glucosa y/o ácido adípico como fuente de carbono como se indica en la Tabla 1. Las placas de agar fueron incubadas a 25°C y después de 7 días de crecimiento, las colonias fueron inspeccionadas visualmente.

Tabla 1:

Medio	Glucosa (g/l)	Ácido adípico (g/l)	Crecimiento	Descripción
1	0,0	10	+/-	Apenas hay crecimiento, si es que lo hay
2	0,0	80	+/-	Apenas hay crecimiento, si es que lo hay
3	0,1	0	+	Pequeñas colonias
4	0,1	10	++	Medianas colonias
5	0,1	80	+++	Grandes colonias

A partir de la tabla se puede sacar la conclusión de que la cepa de *Penicillium chrysogenum* que produce el adipoil-7-ADCA apenas crece en un medio de agar con ácido adípico como la única fuente de carbono. Sin embargo, en la presencia de una pequeña cantidad de glucosa, el rendimiento es aumentado sustancialmente en la presencia de ácido adípico, haciendo posible por lo tanto la discriminación entre cepas que utilizan un adipato y cepas que no utilizan un adipato.

**Ejemplo 2**

Selección de cepas mutantes de *Penicillium chrysogenum* que producen el adipoil-7-ADCA con una incorporación mejorada de ácido adípico desde el medio dentro del adipoil-ADCA.

Una suspensión de conidiosporas de la cepa de *Penicillium chrysogenum* que produce el adipoil-7-ADCA, construida tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 fue irradiada con luz UV hasta llegar a una supervivencia de 0,2 %. Subsiguientemente, unos matraces con sacudimiento que contenían 25 ml de un medio líquido descrito en el Ejemplo 1, suplementado con 40 g/l de ácido adípico como la única fuente de carbono, fueron inoculados con la suspensión de conidiosporas irradiada con luz UV e incubados durante 2 días a 25°C y a 280 rpm (revoluciones por minuto) hasta que tuvo lugar una germinación suficiente. Las esporas que no fueron capaces de germinar eran sospechosas de haber perdido (la mayor parte de) su capacidad para usar ácido adípico como una fuente de carbono. Después de que hubo germinado un 95 % de las esporas, el micelio y las esporas remanentes se separaron haciendo pasar el caldo de filtración a través de un filtro Miracloth.

Las esporas que pasaban por el filtro fueron inoculadas en un medio líquido de nueva aportación, que contenía 40 g/l de ácido adípico como la única fuente de carbono. Después de cultivar durante 3 días, el micelio y las esporas remanentes se separaron de nuevo haciendo pasar el caldo de fermentación a través de un filtro Miracloth, y las esporas recogidas de esta manera fueron inoculadas en el medio de agar que se ha descrito en el Ejemplo 1, que contenía 80 g/l de monohidrato de lactosa y 5 g/l de monohidrato de glucosa como fuentes de carbono. Después de que hubieron crecido las colonias, alrededor de 25.000 colonias fueron sembradas en placas con réplicas sobre placas de agar de nueva aportación con la composición del medio nº 5 de la Tabla 1.

5 De las colonias que no crecían, se seleccionaron 125 cepas y se ensayaron en el medio líquido que se ha descrito en el párrafo anterior, suplementado con 20 g/l de ácido adípico como el compuesto precursor de cadena lateral. Después de siete días se tomaron muestras de los cultivos y el material sobrenadante se usó para determinar el nivel de adipoíl-7-ADCA (tal como se describe en el documento de patente de los EE.UU. US6410259). La Tabla 2 muestra que se obtuvieron 2 cepas que tenían una incorporación significativamente mejorada de ácido adípico desde el medio dentro del adipoíl-7-ADCA en comparación con el testigo (cepa parental).

Tabla 2.

Cepa	Rendimiento de incorporación de adipato* (%)	Mejoría en el factor del rendimiento de incorporación de adipato	Productividad de adipoíl-7-ADCA (testigo = 100 %)
Testigo (parental)	22,4	1,00	100
Mutante A	30,4	1,36	110
Mutante B	33,6	1,50	120
Mutante C	38,8	1,70	62
Mutante D	89,4	4,00	50

\* Véase su definición en el texto

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la construcción de una cepa microbiana mutante capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N cuando se cultivan en un medio de cultivo que comprende ácido adípico y que tiene un rendimiento mejorado de incorporación del ácido adípico desde el medio de cultivo dentro del compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N en comparación con la cepa parental no mutante, comprendiendo el método de las operaciones de:
- 5 a) Obtener conidiosporas de una cepa microbiana parental capaz de producir un compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N
  - b) Someter a la conidiosporas obtenidas en la etapa a) a condiciones mutagenizantes
  - 10 c) Cultivar las conidiosporas obtenidas en la etapa b) en un medio que contiene ácido adípico como la principal fuente de carbono, con lo que las esporas que son capaces de usar ácido adípico como una fuente de carbono germinarán, crecerán y formarán un micelio
  - d) Separar el micelio desde las conidiosporas remanentes
  - e) Opcionalmente repetir las etapas b) y c) y d) una o más veces,
  - 15 f) Inocular las conidiosporas procedentes de la etapa d) en un medio que contiene una fuente apropiada de carbono para permitir el crecimiento de colonias individuales.
  - g) Replicar las colonias que crecen, procedentes de la etapa f), en un medio que contiene una apropiada cantidad de ácido adípico para permitir la identificación de colonias que no crecen o que crecen más lentamente.
  - h) Seleccionar las colonias que crecen en la etapa f) y las que pertenecen a las colonias que no crecen o que crecen más lentamente de la etapa g).
- 20 2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el rendimiento mejorado de incorporación es de por lo menos 5 %, en donde dicho rendimiento mejorado de incorporación es expresado como la mejoría relativa de la cepa microbiana mutante en comparación con la cepa microbiana parental.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto de  $\beta$ -lactama adipoilada en N se selecciona entre el conjunto que consiste en el adipoil-6-APA, el adipoil-7-ADCA, el adipoil-7-ACA, el adipoil-7-ACCA, el adipoil-7-PACA, el adipoil-7-ADAC y el adipoil-7-ACCCA.
- 25 4. El método de las reivindicaciones 1-3, en el que la cepa es un hongo o una bacteria.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el hongo pertenece al género *Penicillium*.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el hongo es *Penicillium chrysogenum*, transformado preferiblemente con, y que expresa, un gen que codifica una expandasa o una expandasa/hidrolasa.