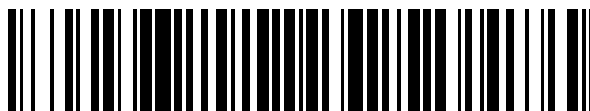


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 454**

51 Int. Cl.:

**C07D 501/00** (2006.01)

**C12P 35/06** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2007 E 07712302 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1987041**

54 Título: **Producción mejorada de cefalosporina**

30 Prioridad:

**23.02.2006 EP 06110332**

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

**20.09.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HANS, MARCUS;  
BOVENBERG, ROELOF ARY LANS;  
VAN DEN BERG, MARCO ALEXANDER;  
DRIESSEN, ARNOLD JACOB MATTIEU y  
NIJLAND, JEROEN GERBEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 423 454 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

Producción mejorada de cefalosporina

La presente invención se refiere a la producción fermentativa de una cefalosporina en un microorganismo.

5 El hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* es un productor natural de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tales como penicilina G. En las últimas décadas, las capacidades de producción de penicilina G mejoraron enormemente mediante mejora de la cepa clásica, dando como resultado cepas de producción industrial poderosas. Recientemente, por medio de manipulación mediante ingeniería genética de la ruta metabólica, se integraron con éxito varias rutas para la producción de cefalosporina en las cepas de producción de penicilina, en particular *Penicillium chrysogenum*. En el documento EP-A-0532341, se transformó *Penicillium chrysogenum* con el gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus* que codifica una expandasa que permite a la cepa transformada producir adipil-7-ADCA (ácido adipil-7-amino-3-metil-3-cefem-4-carboxílico) cuando se cultiva en presencia del precursor ácido adipico. En el documento EP-A-0540210, además del gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus*, se transformó *Penicillium chrysogenum* con un gen de hidroxilasa cuyo producto de expresión convierte la cadena lateral de 3-metilo de adipil-7-ADCA en 3-hidroximetilo, para dar ácido adipil-7-aminodesacetilcefalosporánico (adipil-7-ADAC); en otro ejemplo, en el documento EP-A-0540210, *Penicillium chrysogenum*, ya transformado con genes que codifican expandasa e hidroxilasa, se transforma adicionalmente con un gen de acetiltransferasa cuyo producto de expresión convierte la cadena lateral 3-hidroximetilica en la cadena lateral 3-acetiloximetilica para dar adipil-7-ACA. En el documento WO 2004/106347, una cepa de *Penicillium chrysogenum* se ha transformado con genes que codifican una expandasa, una hidroxilasa y una enzima O-carbamoil transferasa, dando como resultado ácido adipil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico.

Las cepas industriales de *Penicillium chrysogenum* se han seleccionado por su capacidad para producir y segregar grandes cantidades de una variedad de compuestos beta-lactámicos, en particular penicilina G y penicilina V, en el medio de cultivo. Varias líneas de prueba indican que la secreción de beta-lactama es un proceso activo, posiblemente vía proteínas de transporte. Durante las últimas etapas de tales procesos de fermentación, se encuentran títulos extremadamente elevados de beta-lactama en fermentaciones a escala industrial. El documento WO 01/32904 describe varios polipéptidos transportadores ABC que están implicados en la secreción de penicilina G. La potenciación de la actividad transportadora ABC dio como resultado una secreción potenciada del compuesto beta-lactámico.

La producción de moléculas de cefalosporina en hospedantes de producción recombinante no cefalosporínicos naturalmente, tales como las cepas de *Penicillium* explicadas aquí anteriormente, todavía plantea varios problemas. Por ejemplo, el nivel de secreción de los compuestos deseados es todavía relativamente bajo y se debe de incrementar a fin de ser tanto técnica como económicamente más atractivo. La tasa de producción de cefalosporinas producidas en *P. chrysogenum* estará limitada debido al hecho de que los transportadores de penicilina, es decir, los polipéptidos transportadores ABC, tendrán una baja afinidad por el compuesto cefalosporínico. Se ha sugerido en el documento WO 01/32904 que esto se podría superar clonando uno o más polipéptidos transportadores ABC homólogos, a partir de productores naturales de cefalosporina tales como *Acremonium chrysogenum* usando los polinucleótidos que codifican los transportadores ABC descritos en el documento WO 01/32904.

El hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum* es un productor natural de cefalosporinas tales como cefalosporina C. En una cepa particular de este hongo, *Acremonium chrysogenum* C10, se ha identificado recientemente un gen *CefT* que codifica una proteína de la bomba de flujo putativa y, al mismo tiempo, aumenta significativamente la producción de cefalosporina C (Ullán et al. (2002) Mol. Genet. Genomics, 267, 673-683; Liras y Martin (2006) International Microbiology 9, 9-19; Martin et al. (2005) Curr. Opinion Microbiol. 8, 282-293). La secuencia nucleotídica del gen *CefT* se ha depositado en la base de datos nucleotídica del National Center for Biotechnology Information con el número de acceso (locus) AJ487683. El NCBS se puede acceder en INTERNET en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), y la secuencia nucleotídica del gen *CefT* en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=21214008>. A partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el *CefT*, los autores concluyeron que es una proteína transmembránica puesto que tiene 12 segmentos transmembránicos (TMS) y contiene los motivos A, B, C, D2 y G característicos del grupo de 12 TMS del antiportador fármaco:H<sup>+</sup> de la superfamilia de facilitadores principales. La proteína *CefT* confiere resistencia a ciertos ácidos orgánicos tóxicos, incluyendo ácido isovalérico y ácido fenilacético, como se concluyó a partir del hecho de que estos ácidos fueron tóxicos a una cepa de *Acremonium* en la que la *CefT* se inactivó. La sobreexpresión del gen homólogo *CefT* dio como resultado una producción mejorada de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*. Este no fue el caso cuando se usó una forma truncada del gen *CefT*. Sin embargo, la inactivación específica del gen *CefT* no afectó a la producción de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*, lo que sugiere que hay sistemas redundantes implicados en la exportación de cefalosporina en *Acremonium chrysogenum*.

La proteína *CefT* de *Acremonium chrysogenum* C10 no pertenece a la familia de transportadores ABC. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína *CefT* de *Acremonium chrysogenum* C10 (Ullán et al (2002)) con cualquier secuencia de aminoácidos de los transportadores ABC descritos en el documento WO

01/32904 revela que la proteína CefT no tiene ninguna homología con las proteínas transportadoras ABC (es decir, <25%).

La expresión "gen CefT" se refiere a un gen que codifica una proteína CefT, es decir, una proteína implicada en el transporte de un compuesto cefalosporínico desde el interior del microorganismo productor de cefalosporina hacia el exterior del microorganismo productor de cefalosporina. Un ejemplo de tal gen CefT de la cepa *Acrymonium chrysogenum* C10 se puede encontrar en Ullán et al (2002), que también describe la secuencia de aminoácidos de la proteína CefT codificada por el gen CefT.

La expresión "gen CefT heterólogo" significa que el gen CefT se puede obtener de cualquier microorganismo hospedante y se usa para transformar un microorganismo productor de cefalosporina, con la condición de que el microorganismo hospedante adecuado del que deriva el gen CefT no sea la misma especie que el microorganismo productor de cefalosporina transformado con el gen CefT.

La expresión "gen CefT homólogo" significa que el gen CefT se obtiene de cualquier microorganismo hospedante adecuado y se usa para transformar un microorganismo productor de cefalosporina, con la condición de que el microorganismo hospedante adecuado del que deriva el gen CefT sea la misma especie que el microorganismo productor de cefalosporina transformado con el gen CefT. La transformación de la cepa *Acrymonium chrysogenum* C10 con un gen CefT homólogo que se origina de la misma cepa *Acrymonium chrysogenum* C10 ha sido descrita por Ullán et al. (2002).

El término "homología" se refiere a la identidad de la secuencia de un primer gen, proteína o enzima con la secuencia de un segundo gen, proteína o enzima. A lo largo de esta descripción, el grado de homología se expresa como un porcentaje de identidad con un gen, proteína o enzima de referencia. La determinación de estas homologías se puede llevar a cabo por métodos conocidos por el experto, por ejemplo usando la secuencia proteica de la proteína de referencia como "secuencia de interrogación" para llevar a cabo una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden llevar a cabo usando programas BLAST (versión 2.2) usando los parámetros por defecto del programa respectivo. Véase, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo productor de cefalosporina caracterizado por que se ha transformado con un gen *CefT* heterólogo y con lo que el microorganismo transformado tiene una capacidad productora de cefalosporina mejorada en comparación con el microorganismo que no se transformó con el gen *CefT* heterólogo. Una capacidad productora de cefalosporina mejorada se define aquí como la relación de la capacidad de producción de cefalosporina del microorganismo transformado en comparación con la capacidad de producción de cefalosporina del microorganismo que no es transformado con el gen *CefT* heterólogo, que es al menos 1,2, más preferiblemente al menos 1,4, más preferiblemente al menos 1,6, más preferiblemente al menos 1,8, más preferiblemente al menos 2,0, más preferiblemente al menos 2,1, más preferiblemente al menos 2,3, más preferiblemente al menos 2,5, más preferiblemente al menos 3,0, más preferiblemente al menos 5,0, más preferiblemente al menos 10. El microorganismo productor de cefalosporina es preferiblemente un microorganismo que es por naturaleza capaz de producir compuestos beta-lactámicos tales como penicilinas y cefalosporinas, y se puede seleccionar del grupo que consiste en *Penicillium*, *Aspergillus*, *Streptomyces* y *Acremonium*. En este grupo, varios microorganismos poseen la capacidad de producir cefalosporina por naturaleza, tales como *Streptomyces* y *Acremonium*, o penicilinas por naturaleza, tales como *Penicillium* y *Aspergillus*. Otros microorganismos, tales como *Penicillium* como se describe aquí anteriormente, pueden haber adquirido la capacidad para producir cefalosporinas mediante transformación por ingeniería genética, tales como *Penicillium chrysogenum* que, después de haber sido transformado con un gen que codifica expandasa, es capaz de producir derivados N-acilados de 7-ADCA o, cuando se transforma además con hidroxilasa, una hidroxilasa y una acetiltransferasa, o con una hidroxilasa y una acetiltransferasa y una O-carbamoil transferasa, es capaz de producir derivados N-acilados de 7-ADAC, 7-ACA y de ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, respectivamente.

Preferiblemente, el gen *CefT* heterólogo puede derivar de cualquier microorganismo adecuado productor de cefalosporina, pero deriva preferiblemente de *Acremonium*, más preferiblemente de *Acremonium chrysogenum*, lo más preferible de *Acremonium chrysogenum* C10, como se describe por Ullán et al (2002). Para los fines de la invención, también se puede usar un homólogo de un gen *CefT* heterólogo adecuado, por ejemplo un gen CefT que codifica una proteína CefT con una homología de más de 30%, preferiblemente una homología de más de 40%, preferiblemente una homología de más de 50%, preferiblemente una homología de más de 60%, preferiblemente una homología de más de 70%, preferiblemente una homología de más de 80%, preferiblemente una homología de más de 90% en base a la proteína cuando se compara con la proteína CefT de *Acremonium chrysogenum* C10 como se describe por Ullán et al (2002).

Una realización preferida de la presente invención es una cepa de *Penicillium*, preferiblemente *Penicillium chrysogenum*, que ha adquirido la capacidad para producir un derivado de 7-ADCA N-sustituido mediante ingeniería genética como resultado de su transformación con un gen que codifica una expandasa - por ejemplo como se describe en el documento EP-A-0532341 - y además ha sido transformada con un gen *CefT* heterólogo, preferiblemente un gen CefT de *Acremonium*, más preferiblemente con un gen CefT de *Acremonium chrysogenum*; lo más preferido es el gen CefT de *Acremonium chrysogenum* C10 que codifica la proteína CefT con la secuencia de

aminoácidos como se ha descrito en Ullán et al (2002). Otra realización preferida de la presente invención es una cepa de *Penicillium*, preferiblemente *Penicillium chrysogenum*, que ha adquirido la capacidad para producir un derivado de 7-ADAC N-acilado, mediante ingeniería genética como resultado de su transformación con un gen que codifica una expandasa y una hidroxilasa como se describe en el documento EP-A-0540210 y además ha sido transformada con un gen *CefT* heterólogo, preferiblemente con un gen *CefT* de *Acremonium*, más preferiblemente con un gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum*; lo más preferido es el gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum* C10 que codifica la proteína *CefT* con la secuencia de aminoácidos como se ha descrito en Ullán et al (2002). Otra realización preferida de la presente invención es una cepa de *Penicillium*, preferiblemente *Penicillium chrysogenum*, que ha adquirido la capacidad para producir un derivado de 7-ACA N-acilado, mediante ingeniería genética como resultado de su transformación con un gen que codifica una expandasa y una hidroxilasa y una aciltransferasa como se describe en el documento EP-A-0540210 y además se ha transformado con un gen *CefT* heterólogo, preferiblemente con un gen *CefT* de *Acremonium*, más preferiblemente con un gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum*; lo más preferido es el gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum* C10 que codifica la proteína *CefT* con la secuencia de aminoácidos como se ha descrito en Ullán et al (2002). Otra realización preferida de la presente invención es una cepa de *Penicillium*, preferiblemente *Penicillium chrysogenum*, que ha adquirido la capacidad para producir un derivado N-acilado de ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico mediante ingeniería genética como resultado de su transformación con un gen que codifica una expandasa, una hidroxilasa y una O-carbamoil transferasa como se describe en el documento WO 2004/106347 y además ha sido transformada con un gen *CefT* heterólogo, preferiblemente con un gen *CefT* de *Acremonium*, más preferiblemente con un gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum*; lo más preferible es el gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum* C10 que codifica la proteína *CefT* con la secuencia de aminoácidos como se ha descrito en Ullán et al (2002).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para la construcción de un microorganismo productor de cefalosporina según la invención, que comprende las etapas de aislar el gen *CefT* heterólogo de un microorganismo hospedante adecuado y transformar el microorganismo productor de cefalosporina con el gen *CefT* aislado, con la condición de que el microorganismo hospedante no sea la misma especie que el microorganismo productor de cefalosporina. En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para la construcción del microorganismo productor de cefalosporina según la invención, que comprende las etapas de aislar el gen *CefT* heterólogo de *Acremonium*, preferiblemente *Acremonium chrysogenum*, lo más preferible *Acremonium chrysogenum* C10 como se describe por Ullán et al (2002), y transformar el microorganismo productor de cefalosporina, preferiblemente *Penicillium*, más preferiblemente *Penicillium chrysogenum* transformado con un gen que codifica una expandasa y opcionalmente uno o más de los genes que codifican una hidroxilasa, aciltransferasa y O-carbamoil transferasa, proporcionando así la cepa de *Penicillium* con la capacidad para producir 7-ADCA, 7-ADAC, 7-ACA y ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico N-acilado como se describe anteriormente, con el gen *CefT* aislado.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de una cefalosporina, que comprende cultivar el microorganismo productor de cefalosporina correspondiente de la invención según métodos conocidos en la técnica. Realizaciones preferidas de la invención son procedimientos para la producción de derivados N-acilados de 7-ADCA, 7-ACA, 7-ADCA y de ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico. Una realización preferida de la invención es un procedimiento para la producción de un derivado adipílico de 7-ADCA, 7-ACA, 7-ADCA o de ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico usando procedimientos de fermentación como se describen en los documentos EP-A-0532341, EP-A-0540210 y WO 2004/106347.

## EJEMPLOS

### Materiales y métodos generales

Se llevaron a cabo procedimientos estándar como se describe en Sambrook, J. et al. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Se amplificó ADN usando las polimerasas de corrección Turbo-Pfu-Polymerase o Herculase (Stratagene, Países Bajos), siguiendo el protocolo del fabricante, mientras que se logró la verificación de las cepas y plásmidos construidos usando Taq polimerasa. Las enzimas de restricción procedieron de Invitrogen o New England Biolabs. Para clonación rutinaria, se emplearon las cepas Top10 y DH10B de *Escherichia coli* (Invitrogen). La verificación de los plásmidos construidos se llevó a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación subsiguiente (Seqlab GmbH, Goettingen, Alemania).

El hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089) se usó como hospedante para la modificación genética y construcción de la cepa de producción.

### Ejemplo 1

Construcción del casete de expresión de *CefT* para la transformación en *Penicillium chrysogenum*

Se usó DH5a de *Escherichia coli* como cepa hospedante para la transformación de frecuencia elevada, la amplificación de ADN plasmídico (Sambrook, 1989) y la construcción del plásmido usando el kit de construcción de vector de tres fragmentos Multisite Gateway® de Invitrogen con diferentes vectores. Para la clonación de la región

promotora de 920 pb en dirección 5' del gen *pcbC*, se usó el vector pDONR™ P4-P1R. El sitio attB4F se añadió mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cebador attB4-F-IPNS, y el sitio attB1R se añadió con el cebador attB1-R-IPNS. El producto de la PCR amplificado se clonó en pDONR™ P4-P1R usando BP clonasa, creando el promotor pDONR™ P4-P1R-IPNS. Para clonar el gen *CefT* de *Acremonium chrysogenum* (acCefT), se usó el vector de puerta pDONR™ 201. El sitio attB1F se añadió mediante PCR usando el cebador attB1F-AcCefT, y el sitio attB2R se añadió usando attB2R-AcCefT-minus-Stop. El gen AcCefT amplificado se clonó en pDONR™ 201 usando BP clonasa, produciendo pDONR™ 201-AcCefT. El codón de parada de AcCefT se eliminó para permitir fusiones con una etiqueta His o una etiqueta GFP en el sitio carboxiterminal del gen. Para añadir el sitio attB2F a la región terminadora de 551 pb en dirección 3' del gen *penDE* para la clonación en el pDONR™ P2R-P3, se usó el cebador attB2F-His8x-Tat. Junto con el cebador attB3R-Tat la región terminadora se clonó y se añadió una etiqueta HIS con un codón de parada para crear el vector pDONR™ P2-P3R-HIS-Tat. Para obtener una fusión carboxiterminal con GFP, se usaron los cebadores attB2R-GFP y attB3R-Tat para crear el vector pDONR™ P2-P3R-GFP-Tat.

Combinando estos vectores pDONR™ en el pDEST™ R4-R3 en la reacción LR del kit de construcción de vector de tres fragmentos Multisite Gateway®, se obtuvo un vector de destino con respectivamente el promotor PcbC, el gen AcCefT, la etiqueta His o GFP y el terminador del gen PenDE.

Tabla 1. Cebadores usados para la clonación Gateway®. Los nucleótidos en negrita representan los sitios de recombinación att del sistema Gateway®, en cursiva representan nucleótidos para mantener el marco entre la etiqueta HIS, la etiqueta GFP y el gen AcCefT, y los nucleótidos subrayados representan los 8 aminoácidos de la etiqueta de HIS.

attB4-F-IPNS	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCCTTATACTGGGCCTGCTG CATTGG
attB1-R-IPNS	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCCTCTAGAAAAATAATGGTGA AAACTTGAAGGCGT
attB 1F-AcCefT	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTC7ATGGCGAACAAATTCT GGAACAACACACAGTG
attB2R-AcCefT-minus-Stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGGGTTGCTCACGTAG CTGATAGCC
attB2F-His8x-Tat	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCACCATCACCATCACCATCACCATTG AAGGCTCTTCATGACGAGCCAATGC
attB2F-GFP	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG
attB3R-Tat	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCCTGAAAGAGTTGATATTGAA GGTAGTAGG

### Ejemplo 2

Transformación de *Penicillium chrysogenum* ATCC 28089 *CefE/CefF/Cmch* (construcción descrita en el documento WO 2004106347) con el casete de expresión de *CefT* diseñado en el Ejemplo 1

Para los experimentos de transformación de *Penicillium chrysogenum* ATCC 28089 *CefE/CefF/Cmch*, se usó una cepa que produjo alrededor de 0,3 g/l de ácido adipil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico. Se obtuvieron protoplastos y se aislaron, y la transformación (Alvarez, 1987) se realizó mediante cotransformación del vector pDEST™ P4-R3 con el promotor *pcbC*, el gen *CefT* y el terminador *penDE*, y como marcador de selección se usó el gen *AMDS* en placas con acetamida como única fuente de nitrógeno. Se aisló ARN total de los transformantes usando Trizol® (Invitrogen), y los transformantes positivos se determinaron con perlas de RT-PCR (Amersham) usando un cebador específico para AcCefT (AcCefT F1; 5'-TCGATTCGTACCAGCACCAGGC-3') y un cebador attB2-etiqueta HIS-tag (5'-TGGTGATGGTGATGGTGACCACCTT-3'), para obtener un fragmento de PCR de 384 pb.

### Ejemplo 3

Cultivo de *Penicillium chrysogenum* ATCC 28089 *CefE/CefF/Cmch CefT* y medida de secreción de ácido adipil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

Se inoculó micelio de 5 transformantes de *CefT* en un matraz de agitación de 50 ml en medio mineral que contiene (g/l): glucosa (5); lactosa (80); 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); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5,2); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,8) y 10 mL/L de una disolución A de oligoelementos que contiene ácido cítrico (150); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (15); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (150); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,0075); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,24); CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,375); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (5); MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (2,28); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,99); ácido adipico 3 g/l; pH antes de la esterilización 6,5. Después de un crecimiento durante 7 días a 25°C, 280 rpm, las células se peletizaron, y el sobrenadante se analizó usando RMN para determinar la formación de cefalosporinas. Véase la tabla 2 para los resultados. Los datos muestran claramente el efecto positivo de la integración del gen *CefT* en los genomas de *P. chrysogenum* sobre la producción de cefalosporina.

## ES 2 423 454 T3

Tabla 2: Concentración de ácido adipil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico en cultivos en matraces de agitación en los transformantes de *Penicillium chrysogenum* ATCC 28089 *CefE/CefF/CmcH* con el gen *CefT*.

cepa	Concentración de ácido adipil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico	Relación
cepa	0,30 g/l	1,0
cepa CefT1	0,55 g/l	1,8
cepa CefT2	0,49 g/l	1,6
cepa CefT3	0,63 g/l	2,1
cepa CefT4	0,71 g/l	2,4
cepa CefT5	0,53 g/l	1,8

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una cepa de *Penicillium* productora de cefalosporina que ha adquirido la capacidad de producir cefalosporinas después de haber sido transformada con un gen que codifica expandasa, y opcionalmente después de ser transformada además con un gen que codifica hidroxilasa, una hidroxilasa y una acetiltransferasa, o con una hidroxilasa y una acetiltransferasa y una O-carbamoil transferasa, siendo capaz dicho *Penicillium* de producir derivados N-acilados de 7-ADCA, 7-ADAC, 7-ACA y de ácido 7-amino-3-carbamoil-oximetil-3-cefem-4-carboxílico, respectivamente, caracterizada por que ha sido transformada con un gen *CefT* heterólogo que codifica una proteína CefT que es una proteína implicada en el transporte de un compuesto cefalosporínico desde el interior del microorganismo productor de cefalosporina hacia el exterior del microorganismo productor de cefalosporina, y con lo que la relación de la capacidad de producción de cefalosporina de la cepa de *Penicillium* transformada con el gen CefT heterólogo en comparación con la capacidad de producción de cefalosporina de la cepa de *Penicillium* no transformada con el gen CefT heterólogo es al menos 1,2.
- 10
- 15 2. Un microorganismo productor de cefalosporina según la reivindicación 1, caracterizado por que el gen *CefT* heterólogo que codifica una proteína CefT que es una proteína implicada en el transporte de un compuesto cefalosporínico desde el interior del microorganismo productor de cefalosporina hacia el exterior del microorganismo productor de cefalosporina deriva de *Acremonium*, preferiblemente de *Acremonium chrysogenum*, lo más preferible de *Acremonium chrysogenum* C10, o es un homólogo de dicho gen CefT que codifica una proteína CefT con una identidad de más de 30% en base a la proteína cuando se compara con la proteína CefT de *Acremonium chrysogenum* C10.
- 20 3. Un método para la construcción de una cepa de *Penicillium* según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende las etapas de:
- a. Aislar el gen CefT de un hospedante adecuado; y
  - b. Transformar la cepa de *Penicillium* productora de cefalosporina con el gen CefT aislado en la etapa a,
- con la condición de que el hospedante y el microorganismo productor de cefalosporina no sea el mismo organismo.
- 25 4. Un procedimiento para la producción de una cefalosporina, que comprende cultivar la cepa de *Penicillium* productora de cefalosporina según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que la cefalosporina se selecciona del grupo que consiste en los derivados N-acilados de 7-ADCA, 7-ACA, 7-ACCA y de ácido 7-amino-3-carbamoil-oximetil-3-cefem-4-carboxílico.