

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 476**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2013 PCT/IB2013/050176**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13105030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 13735852 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2802661**

54 Título: **Cefalosporina hidroxilasa mutada y su aplicación en la síntesis del ácido desacetilcefalosporánico**

30 Prioridad:

10.01.2012 IN 105CH2012

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

23.11.2017

73 Titular/es:

**ORCHID CHEMICALS AND PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)
Orchid Towers 313 Valluvar Kottam High Road
Nungambakkam600 034 Chennai, IN**

72 Inventor/es:

**DURAIRAJ, MICHEAL;
THIRUMOORTHY, RAMANAN;
MISHRA, KANHU CHARAN;
CHINNATHAMBI, THANGADURAI;
KRISHNAN, CAVERY MANIAN;
RAJASEKARAN, PADMA;
SUBRAMANI, SUGUMAR;
SELVARAJ, KAVITHA DAFFROSE;
BALAKRISHNAN, NATARAJ;
RAVIKUMAR CHAKRAVARTHY, SATHISH y
NATRAJAN MADHIYAZHAGAN, ARULMOZHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 643 476 T3

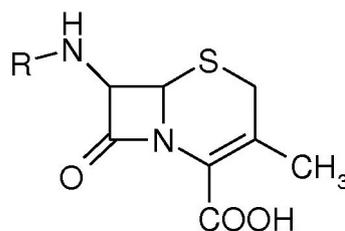
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Cefalosporina hidroxilasa mutada y su aplicación en la síntesis del ácido desacetilcefalosporánico

Campo de la invención:

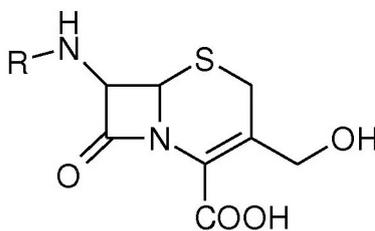
- 5 La presente invención se refiere a una cefalosporina hidroxilasa modificada/mutada de *Streptomyces clavuligerus* que tiene mejor actividad de hidroxilación y especificidad aumentada hacia el compuesto de fórmula (II), que puede incluir ácido fenilacetil-7-aminodesacetoxicefalosporánico (fenilacetil-7-ADCA) y desacetoxicefalosporina C (DAOC),



(II)

en la que R representa, pero sin limitación, hidrógeno, fenilacetilo, fenoxiacetilo, aminoadipilo, glutarilo o cualquier otro grupo adecuado.

- 10 La presente invención describe también un bioprocedimiento para preparar ácido cefalosporánico de Fórmula general I mediante la hidroxilación del correspondiente compuesto de fórmula (II) usando cefalosporina hidroxilasa mutada de la presente invención



(I)

- 15 en la que R representa lo mismo que se describe anteriormente. Dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de ácido α -cetoglutarico y ácido ascórbico.

- 20 La cefalosporina hidroxilasa modificada de *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) y el bioprocedimiento para la síntesis del ácido desacetilcefalosporánico son útiles en el procedimiento para la preparación de ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), desacetil-7-ACA (7-HACA), ácido 7-fenilacetamidodesacetilcefalosporánico (fenilacetil-7-HACA), cefam-4-carboxilato de p-metoxibencil-7-fenilacetamido-3-clorometilo (GCLE), ácido 7-amino-3-vinil-4-cefalosporánico (CAVA), etc.

Antecedentes de la invención:

- 25 Los antibióticos β -lactámicos tales como penicilinas y cefalosporinas son ampliamente usados para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas. Como las cefalosporinas ofrecen mejor protección que las penicilinas, particularmente frente a organismos resistentes, se ha dado un impulso significativo a las derivatizaciones de cefalosporinas para ampliar su espectro y potenciar su eficacia. 7-ADCA (ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico), 7-HACA y 7-ACA sirven como intermedios fundamentales para la síntesis de numerosas cefalosporinas semisintéticas tales como cefradina, cefalexina, cefadroxilo, cefazolina, cefotaxima, ceftriaxona, cefepima, cefoperazona, cefuroxima, cefoxitina y similares. Actualmente, el 7-ACA se deriva de cefalosporina C mediante la escisión de la cadena lateral de 7-aminoadipilo mediante un procedimiento enzimático en dos etapas (documento US 5424196) y el 7-ADCA se deriva mediante la hidrólisis de fenilacetil-7-ADCA por penicilina G amidasa, en el que el fenilacetil-7-ADCA se fabrica mediante la química convencional de expansión de anillo de penicilina G. Al ser 7-ADCA o Cef G más baratos que 7-ACA o Cef C, respectivamente, un procedimiento para convertir viablemente 7-ADCA con o sin un sustituyente en posición 7-amino, como un grupo fenilacetilo, en el correspondiente ácido desacetilcefalosporánico, proporcionaría una alternativa más económica a HACA.
- 30

Se producen penicilinas y cefalosporinas nativas por una variedad de bacterias y organismos fúngicos y se ha realizado un progreso significativo en la comprensión de su arquitectura reguladora (Aharonowitz, Y., *et al.*, Annu. Rev. Microbiol. 46: 461-495, 1992; Axel A. Brakhage, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 547-585, 1998). Se condensan tres aminoácidos, L-valina, L- α -aminoadipato y L-cisteína formando el tripéptido δ -(L- α -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valina, que se cicla entonces formando isopenicilina N. En el caso de los productores de penicilina, se convierte la isopenicilina N en penicilina G, penicilina V, etc. La biosíntesis de cefalosporina por epimerización de isopenicilina N a penicilina N en organismos tales como *C. acremonium*, *S. clavuligerus*, etc. conduce a compuestos cefémicos tales como cefalosporina C y cefamicina C. La etapa limitante de velocidad, o más bien comprometida, en la biosíntesis de cefalosporinas es la expansión del anillo de tiazolidina de 5 miembros de penicilina N al anillo de dihidrotiazina de 6 miembros de desacetoxicefalosporina C (DAOC). En procariotas tales como *Streptomyces clavuligerus*, se cataliza la etapa de expansión de anillo de penicilina N por una enzima llamada desacetoxicefalosporina C sintasa (DAOCS o *cefE* o expandasa) y se lleva a cabo la hidroxilación de DAOC por cefalosporina hidroxilasa (desacetilcefalosporina C sintasa o DACS o *cefF* o hidroxilasa) (Jensen S. E. *et al.*, Journal of Antibiotics, 38, 263-265, 1985). En organismos eucarióticos tales como *Cephalosporium acremonium*, ambas de estas reacciones se catalizan por una sola enzima bifuncional DAOCS-DACS (expandasa-hidroxilasa o *cefEF*) (Dotzla, J. E. y Yeh, W. K., Journal of Bacteriology, 169, 1611-1618, 1987). Posteriormente, la desacetilcefalosporina C (DAC) se acetila a cefalosporina C en *Cephalosporium acremonium*, mientras que en bacterias tales como *Streptomyces clavuligerus*, aparecen modificaciones adicionales que dan como resultado la cefamicina C.

El gen *cefEF* que codifica 332 aminoácidos codifica la expandasa-hidroxilasa en *C. acremonium* (Samson, S. M., *et al.*, Nature Biotechnology, 5, 1207-1215, 1987).

El gen de desacetilcefalosporina C sintasa (*cefF*) se ha clonado y secuenciado de *S. clavuligerus* y codifica 318 aminoácidos (Kovacevic, S. y Miller, J. R., Journal of Bacteriology, 173, 398-400, 1991). La hidroxilasa tiene un 54 % de identidad de secuencia aminoacídica con la expandasa-hidroxilasa de *C. acremonium*. Las enzimas expandasa, expandasa-hidroxilasa e hidroxilasa son oxigenasas dependientes de hierro (II) y α -cetoglutarato y son parte de una subfamilia de enzimas ferrosas mononucleares.

La penicilina N es el sustrato natural para expandasa y expandasa-hidroxilasa y DAOC es el sustrato para hidroxilasa. Sin embargo, se ha detectado una especificidad de sustrato alterada de expandasa-hidroxilasa para diferentes sustratos tales como penicilina G, penicilina V, 6- α -metilpenicilina N y adipoil-6-APA (Lloyd *et al.* Journal of Biological Chemistry, 279, 15420-15426, 2004). Como resultado, el desarrollo de tecnologías verdes para la fabricación de intermedios de cefalosporina está por tanto restringido a estas enzimas. Sin embargo, estas enzimas muestran una mala capacidad de conversión de sustratos fácilmente disponibles tales como fenilacetil-7-ADCA y, por ello, se requiere genomanipularlas para aplicaciones comerciales. El documento WO 2008/107782 (445/CHE/2007) describe tales manipulaciones para hidroxilasa y su uso en el bioprocedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I), algunas de las cepas obtenidas según esta patente, como MTCC 5739, MTCC 5741 y MTCC 5746 a MTCC 5749, no son industrialmente escalables debido a la mala actividad hidroxilasa y por ello sigue requiriéndose identificar un mejor mutante de hidroxilasa con vistas a la producción industrial.

También en publicaciones como Baker, B. J., *et al.*, Journal of Biological Chemistry 266, 5087-5093, 1991; Coque, J. J. R., *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology 44, 605-609, 1996, se ha descrito la conversión de ácido 7-aminoadipoildesacetoxicefalosporánico en el correspondiente ácido desacetilcefalosporánico. Cuando se ensayaron, estos procedimientos no convertían más de un 5 % del sustrato a concentraciones muy bajas. Estos procedimientos no eran por tanto prácticos ni escalables. En la técnica anterior no se divulga un procedimiento escalable para la hidroxilación de desacetoxicefalosporinas.

El documento EP 465189 proporciona compuestos de ADN que codifican la actividad hidroxilasa de *S. clavuligerus*. Esta patente divulga el procedimiento para expresar la actividad hidroxilasa de *S. clavuligerus* en una célula hospedadora recombinante. El compuesto de ADN que codifica la actividad hidroxilasa se aisló del ADN genómico de *S. clavuligerus* y se usa para construir un vector de expresión de ADN recombinante llamado pOW399. El gen de hidroxilasa clonado se usa en la hidroxilación de compuestos de cefalosporina; sin embargo, la actividad de la enzima es insatisfactoria para fabricación industrial.

El documento US 6.180.361 trata sobre compuestos de ADN, vectores de clonación y expresión de ADN recombinantes que codifican la actividad DAOCS y DACS. El compuesto de ADN que codifica las actividades DACS/DAOCS se aisló de ADN genómico de *Cephalosporium acremonium* y se usa para construir vectores de expresión de ADN recombinante. Esta invención divulga también un procedimiento para expresar un polipéptido de desacetoxicefalosporina C sintetasa/hidroxilasa de *Cephalosporium* en una célula hospedadora recombinante.

El documento WO01/85951 describe una expandasa modificada y polinucleótidos que codifican la expandasa modificada, y en particular una expandasa tal como penicilina N expandasa que tiene una especificidad aumentada por un sustrato tal como penicilina G frente al tipo silvestre.

Por ello, existe la necesidad de identificar una cefalosporina hidroxilasa con actividad potenciada para la hidroxilación del compuesto de fórmula (II), que sea económica e industrialmente escalable. Como la cefalosporina

5 hidroxilasa nativa muestra mala afinidad por el compuesto de Fórmula (II), la utilidad industrial demanda el desarrollo de una hidroxilasa modificada para potenciar su actividad. Como resultado, la presente invención está relacionada con el desarrollo de una hidroxilasa modificada de *S. clavuligerus* que tenga especificidad de sustrato aumentada por sustratos tales como el compuesto de Fórmula (II), en comparación con la hidroxilasa de tipo silvestre. La invención actual proporciona también un procedimiento escalable para la hidroxilación de ácido desacetoxicefalosporánico catalizada por la cefalosporina hidroxilasa modificada o cualquier hidroxilasa dependiente de ácido α -cetoglutarico.

Sumario de la invención:

10 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una hidroxilasa mutante que porta sustituciones aminoácidas en las posiciones de residuo de la hidroxilasa de tipo silvestre de secuencia seleccionadas de:

- i) P72L, T90A, V206I, A210V, A311 V
- ii) P7L, P72L, T90A, A237V, A311V
- iii) T51M, P72L, T90A, A311V
- iv) A40V, P72L, T90A, A311 V
- 15 v) P72L, T90A, A237V, A311 V
- vi) P72L, T90A, M233I, A311V
- vii) P72L, T90A, E258K, A311V
- viii) P72L, T90A, F195L, A311V
- ix) P72L, T90A, R250L, A311V
- 20 x) P72L, T90A, V226I, A311 V
- xi) P72L, T90A, V206I, A210V, T273A, A311 V
- xii) P7L, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- xiii) P7L, P72L, T90A, T273A, A311 V
- xiv) P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- 25 xv) T51M, P72L, T90A, T273A, A311V
- xvi) A40V, P72L, T90A, T273A, A311V
- xvii) P72L, T90G, A237V, T273A, A311V
- xviii) T51M, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- xix) A40V, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- 30 xx) T51M, P72L, T90A, M229I, T273A, A311V
- xxi) A40V, P72L, T90A, M229I, T273A, A311V
- xxii) A40V, P72L, T90A, M229I, F267L, T273A, A311V
- xxiii) A40V, P72L, T90A, A177V, M229I, F267L, T273A, A311V
- xxiv) A40V, P72L, T90A, F195L, M229I, F267L, T273A, A311V
- 35 xxv) A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M229I, T273A, A311V
- xxvi) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, T273A, A311V
- xxvii) A40V, P72L, T90A, Q209E, M229I, V249I, T273A, A311V
- xxviii) A40V, P72L, T90A, Q209E, M229I, T273A, A311V
- xxix) A40V, P72L, E82D, T90A, Q209E, M229I, L236V, V249I, T273A, A311V
- 40 xxx) A40V, P72L, T90A, V221P, M229I, T273A, A311V

ES 2 643 476 T3

- xxxi) A40V, P72L, T90A, V221H, M229I, T273A, A311V
- xxxii) A40V, P72L, T90A, R182S, M229I, T273A, A311V
- xxxiii) A40V, P72L, T90A, A177V, M229I, T273A, A311V
- xxxiv) A40V, P72L, T90A, V171M, M229I, T273A, A311V
- 5 xxxv) A40V, P72L, T90A, M229I, S260G, T273A, A311V
- xxxvi) A40V, P72L, T90A, M229I, S251F, T273A, A311V
- xxxvii) A40V, P72L, T90A, F195L, M229I, T273A, A311V
- xxxviii) A40V, P72L, T90A, V226I, M229I, T273A, A311V
- xxxix) A40V, P72L, T90A, M229I, R250L, T273A, A311V
- 10 xl) A40V, P72L, T90A, M229I, E258K, T273A, A311V
- xli) A40V, P72L, T90A, M229I, M233I, T273A, A311V
- xlii) A40V, P72L, T90A, F195L, V226I, M229I, T273A, A311V
- xliii) A40V, P72L, T90A, F195L, R250L, M229I, T273A, A311V
- xliv) A40V, P72L, T90A, V226I, M229I, R250L, T273A, A311V
- 15 xlv) A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M229I, F267L, T273A, A311V
- xlvi) A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M233I, M229I, F267L, T273A, A311V
- xlvii) A40V, P72L, T90A, V 171 L, M229I, F267L, T273A, A311 V
- xlviii) A40V, P72L, T90A, V171L, F195L, M229I, F267L, T273A, A311V
- xlix) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, M233I, F267L, T273A, A311V
- 20 l) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, E258K, F267L, T273A, A311V
- li) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
- lii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V, N313D
- liii) A40V, P72L, T90A, V171L, A177V, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V, N313D
- liv) A40V, P72L, T90A, R91G ,V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
- 25 lv) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, A280S, T273A, A311V,
- lvi) A40V, M53L, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311M
- lvii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, V226I, M229I, F267L, T273A, A311V
- lviii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311 V
- lix) A40V, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
- 30 lx) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311M
- lxi) A40V, P72L, T90A, T96S, I149T, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
- lxii) A40V, P72L, T90A, V171L, A177V, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
- lxiii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, S251F, F267L, T273A, A311V
- lxiv) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, S260G, F267L, T273A, A311V
- 35 lxv) A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V
- lxvi) A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, T273A, A280S, A311V

Ixvii) A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, T273A, A280S, A311V

Ixviii) A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V

Ixix) A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V

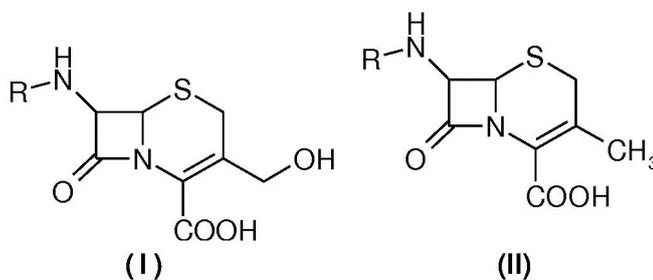
Ixx) A40V, P72L, T90A, G108D, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V.

- 5 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la hidroxilasa mutante del primer aspecto de la invención.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector que contiene la molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

- 10 Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona el microorganismo portador del vector recombinante del tercer aspecto de la invención, capaz de expresar el gen.

Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) que comprende hacer reaccionar el compuesto de fórmula (II) con la enzima reivindicada en la reivindicación 1 en presencia de ácido α -cetoglutarico, ácido ascórbico y sulfato ferroso en un medio acuoso a una temperatura de entre 5 y 25 °C con un pH de 6 a 8,



15

en las que R representa hidrógeno, fenilacetilo, fenoxiacetilo, aminoadipóilo y glutarilo.

Descripción de la Figura:

Figura 1: Se da la secuencia aminoacídica de tipo silvestre de hidroxilasa de *S. clavuligerus* en la SEQ ID No: 1.

Figura 2: Se da la secuencia nucleotídica y aminoacídica de hidroxilasa de *S. clavuligerus* en la SEQ ID No: 1.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

La presente invención proporciona una cefalosporina hidroxilasa mutante que exhibe una actividad aumentada y mayor especificidad por sustratos tales como fenilacetil-7-ADCA que la hidroxilasa de tipo silvestre de la bacteria *S. clavuligerus*. Se clonó esta enzima y el correspondiente gen (gen *cefF*) y se caracterizó (Kovacevic S. y Miller J. R., *Journal of Bacteriology*, 173, 398-400, 1991). Se da la secuencia nucleotídica y aminoacídica de tipo silvestre de hidroxilasa de *S. clavuligerus* en la SEQ ID No: 1 (Figura 2).

25

Las mutaciones de la presente invención proporcionan una hidroxilasa mutada que tiene actividad de hidroxilación potenciada por sustratos tales como fenilacetil-7-ADCA.

La hidroxilasa modificada según la presente invención tiene la siguiente sustitución aminoacídica específica en los residuos aminoacídicos correspondientes a la hidroxilasa de tipo silvestre para el grupo de residuos

- 30 - la prolina en posición 72 es sustituida por leucina, la treonina en posición 90 es sustituida por alanina, la valina en posición 206 es sustituida por isoleucina, la alanina en posición 210 es sustituida por valina, la alanina en posición 311 es sustituida por valina (MTCC 5740)

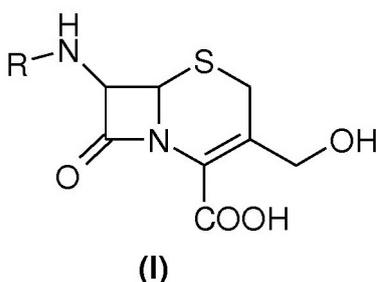
- 35 - la prolina en posición 7 es sustituida por leucina, la prolina en posición 72 es sustituida por leucina, la treonina en posición 90 es sustituida por alanina, la alanina en posición 237 es sustituida por valina, la alanina en posición 311 es sustituida por valina (MTCC 5742)

- la treonina en posición 51 es sustituida por metionina, la prolina en posición 72 es sustituida por leucina, la treonina en posición 90 es sustituida por alanina, la alanina en posición 311 es sustituida por valina (MTCC 5743)

- la alanina en posición 40 es sustituida por valina, la prolina en posición 72 es sustituida por leucina, la treonina en posición 90 es sustituida por alanina, la alanina en posición 311 es sustituida por valina (MTCC 5744)

- 5 - la alanina en posición 40 es sustituida por valina, la prolina en posición 72 es sustituida por leucina, la treonina en posición 90 es sustituida por alanina, la treonina en posición 96 es sustituida por serina, la valina en posición 171 es sustituida por leucina, la arginina en posición 182 es sustituida por triptófano, la metionina en posición 229 es sustituida por isoleucina, la fenilalanina en posición 267 es sustituida por leucina, la treonina en posición 273 es sustituida por alanina, la alanina en posición 311 es sustituida por valina
- 10 - la alanina en posición 40 es sustituida por valina, la prolina en posición 72 es sustituida por leucina, la treonina en posición 90 es sustituida por alanina, la glicina en posición 108 es sustituida por ácido aspártico, la valina en posición 171 es sustituida por leucina, la arginina en posición 182 es sustituida por triptófano, la metionina en posición 229 es sustituida por isoleucina, la fenilalanina en posición 267 es sustituida por leucina, la treonina en posición 273 es sustituida por alanina, la alanina en posición 311 es sustituida por valina (MTCC 5775).
- 15 Es otra realización de la invención proporcionar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la hidroxilasa mutada. Esta molécula de ácido nucleico aislada se obtiene mutando la hidroxilasa de tipo silvestre. La técnica de mutagénesis podría ser química, PCR con tendencia a error o enfoque dirigido a sitio. Puede seleccionarse la técnica de mutagénesis adecuada y usarse para introducir mutaciones y puede clonarse y expresarse la molécula de ácido nucleico mutada y puede estudiarse la propiedad del polipéptido.
- El ácido nucleico mutado puede fusionarse con la secuencia de péptido señal de β -lactamasa y expresarse la proteína de fusión para una expresión de proteína soluble potenciada.
- 20 En otro aspecto de la invención, puede incorporarse la molécula de ácido nucleico mutada a un vector recombinante que es capaz de expresión o replicación cuando se transfiere a una célula hospedadora. La expresión del polipéptido puede controlarse por una secuencia reguladora, probablemente un promotor.
- El vector recombinante puede introducirse en una cepa hospedadora produciendo la desacetilcefalosporina C sintasa mutada.
- 25 La hidroxilasa mutada, cuando se expresa en la cepa hospedadora, puede ser capaz de convertir el sustrato fenilacetil-7-ADCA de fórmula general (II) en fenilacetil-7-HACA de fórmula general (I) por hidroxilación. El fenilacetil-7-HACA puede conducir a 7-HACA por hidrólisis enzimática usando Pen G amidasa o a 7-ACA después de acetilación por acetil transferasa o conversión química adecuada seguida de hidrólisis enzimática usando Pen G amidasa.
- 30 Según la presente invención, el péptido modificado tiene una secuencia aminoacídica diferente de la de SEQ ID NO: 1. Este polipéptido es uno que tiene actividad de hidroxilación, es decir cataliza la hidroxilación de la cadena lateral de 3-metilo de fenilacetil-7-ADCA hasta 3-hidroxi-metilo. La actividad de hidroxilación del polipéptido se modifica o aumenta y también se aumenta la actividad catalizadora por un sustrato distinto que su sustrato natural. La hidroxilasa modificada tiene una actividad catalítica potenciada o especificidad aumentada por otros sustratos tales como fenilacetil-7-ADCA cuando se compara con la hidroxilasa de tipo silvestre.
- 35 Los polipéptidos así producidos a partir de la secuencia nucleotídica mutada pueden usarse para producir quimeras a partir de porciones de otros péptidos de expandasa-hidroxilasa, expandasa e hidroxilasa.
- Los polipéptidos pueden purificarse con un nivel variable de homogeneidad y pueden usarse con otros fines.
- La invención puede usarse para la fabricación de cefalosporinas modificadas mediante tecnologías enzimáticas o basadas en la fermentación *in vivo*. Pueden encontrarse en la bibliografía los procedimientos detallados, tales como la transformación y fermentación de tales células, la purificación y aislamiento.
- 40 Es aún otra realización de la invención proporcionar un procedimiento para producir y elaborar dicha proteína para catalizar la hidroxilación de ácido desacetoxicefalosporánico.
- 45 Las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3) con hidroxilasa modificada pueden expresarse en un matraz o fermentador con una temperatura de preinducción de 25 °C o menos. El cultivo a más de 25 °C antes de la inducción conduce a cuerpos de inclusión y podía encontrarse la expresión óptima en forma activa y soluble 12-25 horas después de la inducción. Las células pueden inducirse con IPTG y recolectarse las células en cualquier momento entre 12 y 30 horas después de la inducción, preferiblemente entre 14 y 20 horas y aún más preferiblemente 16-20 horas. La $DO_{600\text{ nm}}$ de inducción puede ser preferiblemente superior a 60, más preferiblemente superior a 80 y aún más preferiblemente superior a 120.
- 50 El sedimento celular obtenido mediante fermentación puede lisarse después de la adición de una cantidad adecuada de tampón de resuspensión mediante cualquier procedimiento no limitado a sonicación, homogeneización a alta presión, molino de perlas, liofilización o mediante la adición de cualquier producto químico.
- La enzima producida por fermentación puede enriquecerse para obtener enzima utilizable para la catálisis de la hidroxilación del ácido desacetoxicefalosporánico mediante uno o una combinación de procedimientos. Los procedimientos pueden implicar la unión de la proteína a cualquier matriz con dietilaminoetilo (DEAE) u otro grupo

- funcional de intercambio aniónico débil en presencia de tampón Tris o tampón fosfato y eluyendo con una solución de cloruro de sodio (NaCl) 0,4 M. Un procedimiento alternativo puede implicar la adición de polietilenimina (PEI) al 0,3 % (v/p) al lisado celular y el atrapamiento de la enzima en el sedimento formado, o la liberación de la enzima del sedimento a la solución con la adición de NaCl 0,4 M. En aún otro procedimiento alternativo, puede añadirse PEI al 0,1 % (v/v) agitando durante un tiempo adecuado, preferiblemente 1 hora, y centrifugando. Puede añadirse al centrifugado sulfato de amonio al 60 % (p/p), seguido de agitación durante un periodo de tiempo y centrifugado. El sedimento obtenido con la proteína activa puede usarse para elaboración adicional. La proteína activa así obtenida de cualquiera de los procedimientos anteriores puede usarse en forma de solución o en forma de sólido liofilizado o en forma de sólido inmovilizado o en forma de gránulo.
- Es aún otra realización de la presente invención proporcionar un procedimiento escalable para la preparación de ácidos desacetilcefalosporánicos (fórmula I)



en la que R puede ser cualquier grupo de, pero sin limitación, hidrógeno, fenilacetilo, aminoadipóilo, glutarilo, etc.

- Los microorganismos a partir de los cuales puede obtenerse hidroxilasa o expandasa/hidroxilasa son, por ejemplo, *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans* (antiguamente conocido como *Streptomyces lactamdurans*), *Xanthomonas lactamgenus*, *Flavobacterium* sp, *Streptomyces organanencis*, *Streptomyces lactamgens*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces ofivaceus* y *Cephalosporium acremonium*.

- La concentración inicial del sustrato ácido desacetoxicefalosporánico en la reacción puede ser de 0,5-10 %, preferiblemente de 1-10 %, más preferiblemente de 2-10 %, aún más preferiblemente de 3-10 %, aún más preferiblemente de 4-10 % y aún más preferiblemente de 5-10 %.

Un ejemplo de un procedimiento para la preparación de ácidos desacetilcefalosporánicos (fórmula I) comprende las siguientes etapas de:

1. disolver el ácido desacetoxicefalosporánico de fórmula general (II) en un medio acuoso;
2. añadir una relación molar de 1-3 de ácido α -cetoglutárico, y una relación molar de 0,1-1 de ácido ascórbico en comparación con el ácido desacetoxicefalosporánico y sulfato ferroso;
3. añadir la enzima cefalosporina hidroxilasa;
4. llevar a cabo la reacción a pH 5-8,5 y una temperatura entre 5-25 °C;
5. aislar el compuesto de fórmula (II).

- El ácido desacetoxicefalosporánico puede añadirse completamente al inicio de la reacción o añadirse durante un periodo durante el transcurso de la reacción. Puede usarse cualquier base como amoníaco, bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio para solubilizarlo en agua.

- Puede añadirse una relación molar 1-3 de ácido α -cetoglutárico a la reacción, preferiblemente una relación molar 1-2 y aún más preferiblemente una relación molar 1-1,5 toda al inicio o durante el transcurso de la reacción. Puede añadirse una relación molar 0,1-1 de ácido ascórbico a la reacción, preferiblemente puede añadirse 0,2-0,8 todo al inicio o durante el transcurso de la reacción.

La adición de enzima puede usarse en forma de solución o de sólido, en forma libre o atrapada o inmovilizada sobre una matriz y puede añadirse toda al inicio o durante el transcurso de la reacción.

- La reacción puede llevarse a cabo en cualquier intervalo de pH entre 5 y 8,5, preferiblemente entre 6,0 y 8, más preferiblemente de 6,5 a 7,5 y a una temperatura entre 5 y 25 °C, preferiblemente entre 10 y 25 °C y aún más preferiblemente entre 15 y 25 °C.

Se depositaron cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3) que contenían genes de hidroxilasa modificada en la Microbial Type Culture Collection del centro Chandigarh, India de acuerdo con el tratado de Budapest y se les asignaron los

números de acceso (MTCC 5740, MTCC 5742 a MTCC 5745, MTCC 5750 a MTCC 5775) (indicado con la señal ± en la Tabla 1).

Materiales:

5 Todos los productos químicos y reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemicals Pvt. Ltd o USB, EE.UU. Los oligonucleótidos se sintetizaron y suministraron por Eurofins Genomics, Bangalore, India. Las enzimas de restricción, el vector pUC19 para clonación y las cepas se obtuvieron de New England Biolabs Inc, EE.UU. El vector pET24a para expresión, la cepa hospedadora de expresión *Escherichia coli* BL21 (DE3) y el reactivo Bugbuster eran de Novagen, EE.UU. Se obtuvo *Streptomyces clavuligerus* de la American Type Culture Collection, EE.UU. (ATCC). Se adquirió el reactivo de Bradford en Biorad, EE.UU. Se obtuvieron las columnas C₁₈ (50 x 4,6 mm, 5µ, Xterra) de Waters, EE.UU. Se suministraron el kit de aislamiento DNeasy Plant mini gDNA y el kit de extracción en gel QIAEX II por Qiagen, Alemania y se obtuvieron los componentes de medios de cultivo de Becton Dickinson, EE.UU.

Condiciones de crecimiento de *Streptomyces clavuligerus*:

15 Se hizo crecer la cepa de *S. clavuligerus* (ATCC No.27064) en medio YMG que contenía extracto de levadura 4 g, extracto de malta 10 g y glucosa 4 g rellenado hasta 1 litro con agua destilada a pH 7. Se incubó el cultivo a 25 °C y 180 rpm durante 48 horas. Una vez la DO_{600 nm} alcanzó 3, se recolectaron los micelios y se recogieron los sedimentos celulares después de centrifugación a 16.000 rpm durante 15 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa:

20 Se aisló el ADN genómico de los micelios usando el kit de aislamiento DNeasy Plant mini gDNA (Qiagen) de acuerdo con el protocolo proporcionado con el kit. Se amplificó el gen que codifica la hidroxilasa (*ceff*) (número de acceso: M63809) usando 20 pmol de cebadores 5' GCATATGGCGGACACGCCCGTACC 3' y 5' CCCGGCTTGAATGCAACGACGAGCAT 3', dNTP 200 µM, 10 % de DMSO, tampón de ADN polimerasa Deep vent, 2 U de enzima ADN polimerasa Deep vent, MgSO₄ 1 mM y agua en un volumen de reacción final de 100 µl. Las condiciones de PCR consisten en una desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C seguida de 24 ciclos consistentes en desnaturalización a 95 °C durante 40 s, reasociación a 60 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 5 min con una extensión final a 72 °C durante 15 min. Se verificó un producto amplificado de una longitud de aproximadamente 1 kb de fragmento del gen *ceff* por electroforesis en gel de agarosa.

Clonación en pUC19 y pET24a:

30 Se purificó el fragmento de gen de hidroxilasa observado después de amplificación por el kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen) y se clonó en el vector pUC19 mediante ligamiento de extremo romo usando el sitio de restricción *Sma*I, proporcionando pOBTF. Posteriormente, se liberó el fragmento de gen de hidroxilasa por digestión con *Nde*I/*Eco*RI y se ligó en pET24a (+) digerido de forma similar dando el vector pOCPLF y se transformó en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) competente para expresión adicional.

Generación de la proteína de fusión de β-lactamasa:

35 Se obtuvo un cebador que contenía el gen del péptido señal de β-lactamasa y los codones iniciales del gen *ceff* (de Sigma Aldrich) y se fusionó con el gen *ceff* realizando una PCR sin cebadores durante 30 ciclos. Posteriormente, se usó este producto de PCR como molde para otro conjunto de PCR (30 ciclos) en el que el cebador de codificación tenía una parte de la secuencia señal de β-lactamasa y el cebador inverso tenía amplificada la secuencia de *ceff* (del extremo 3'). Las condiciones de PCR permanecen iguales que las descritas anteriormente para amplificar el gen *ceff*. Se sometió a electroforesis la mezcla de PCR en un gel de agarosa y se extrajo el producto génico del gel usando el kit de extracción en gel obtenido de Sigma Aldrich, Bangalore. Se clonó el producto génico fusionado aislado en pBSK mediante ligamiento de extremo romo usando el sitio de restricción *Sma*I y usando protocolos de biología molecular estándares. Posteriormente, se liberó la señal de β-lactamasa-fragmento del gen *ceff* (BF) mediante digestión con *Nco*I y *Hind*III y se ligó en pET24a digerido de forma similar dando el vector pBFP y se transformó en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) competente para expresión adicional del constructo de fusión. Las medidas de expresión y actividad indicaban una actividad dos veces mayor que el constructo original correspondiente.

Mutagénesis y creación de colección:

50 El vector pOBTF servía como molde inicial de mutagénesis aleatoria y dirigida a sitio para generar variantes del gen *ceff*. Se realizó la mutagénesis aleatoria amplificando el gen *ceff* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando condiciones mutagénicas que favorecen la incorporación de nucleótidos no complementarios durante la síntesis de ADN por la ADN polimerasa (mutagénesis con tendencia a error). Esto puede conseguirse eligiendo la ADN polimerasa apropiada (p.ej., se ha usado ADN polimerasa Taq en varios estudios para mutagénesis aleatoria) y/o modificando la composición de la mezcla de reacción de PCR para acentuar la actividad polimerasa con tendencia a error (p.ej., al sesgar la concentración de dNTP en lugar de usar una mezcla equimolar de los cuatro dNTP). Puede hacerse referencia al artículo de Cirino PC, *et al.*, "Generating mutant libraries using error-prone PCR", *Methods Mol Biol.* 2003; 231: 3-9 y a las referencias en el mismo para un protocolo detallado. Se clonan las

copias mutantes de los genes *ceff* así obtenidos en el vector de expresión pET24a y se transforman en la cepa de expresión *E. coli* B121 (DE3), creando una colección de clones que expresan mutantes/variantes de la proteína *ceff*. Se hacen crecer colonias individuales obtenidas en la transformación en placas de cultivo de 96 pocillos y se almacenan como soluciones madre en glicerol a -80 °C. La propiedad deseada puede mejorarse también generando combinaciones de los mutantes obtenidos mediante mutagénesis aleatoria empleando procedimientos como transposición de ADN (combinaciones aleatorias) [Joem JM. "DNA shuffling", *Methods Mol Biol.* 2003; 231: 85-89] y/o mutagénesis dirigida a sitio (combinaciones específicas). Los mutantes pueden optimizarse adicionalmente también incorporando aminoácidos distintos de los obtenidos por mutagénesis aleatoria mediante procedimientos como mutagénesis por saturación de sitio y/o mutagénesis dirigida a sitio. Los protocolos detallados pueden encontrarse en los artículos de Georgescu R, *et al.*, "Saturation mutagenesis", *Methods Mol Biol.* 2003; 231:75-83 y Miyazaki K. "Creating random mutagenesis libraries by megaprimer PCR of whole plasmid (MEGAWHOP)", *Methods Mol Biol.* 2003; 231 23-28 y las referencias en el mismo. Una vez se identifica un mutante con las propiedades deseadas (actividad mejorada en este caso), puede servir como molde para la siguiente ronda de evolución dirigida que implica algunos o todos los procedimientos descritos anteriormente.

15 **Expresión de clones de colección para cribado:**

Se inocularon las soluciones madre en glicerol que contienen los presuntos genes mutantes *ceff* en el vector pET24a (+) en la cepa *E.coli* BL21 (DE3) en placas de 96 pocillos que contienen medio LB con kanamicina (75 µg/ml) para crecimiento durante una noche a 37 °C a 260 rpm. Se subcultivó el cultivo de una noche de nuevo en placas de 96 pocillos profundos que contienen 1 ml de medio LB y se hicieron crecer a 37 °C hasta que la DO_{600 nm} alcanzó de 0,4 a 0,6 y se llevó a cabo la inducción con β-D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 0,1 mM. Después de la inducción, se dejó crecer el cultivo durante 5 horas a 25 °C y se recolectaron las células mediante centrifugación en una centrífuga de microplacas a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se almacenaron los sedimentos a -80 °C hasta uso adicional.

Ensayo para el cribado de actividad:

Se liberó la enzima de los clones expresados usando el reactivo Bugbuster y se ensayó la reacción de hidroxilación con ácido α-cetoglutarico 45 mM, ascorbato 9 mM, sulfato ferroso 0,1 mM, Tris-HCl 355 mM y 0,56 % de fenilacetil-7-ADCA en un volumen de reacción de 200 µl a 25 °C durante 180 minutos con agitación a 220 rpm. Se inactivó la reacción con 200 µl de metanol y se analizó por HPLC. Se han tabulado los datos de actividad en la Tabla 1 con la enzima de tipo silvestre referenciada como 100 %

30 **Monitorización por cromatografía líquida de alta resolución de la actividad hidroxilasa:**

Se recogieron todos los datos de HPLC en un Shimadzu 2010C. Se equilibró una columna C₁₈ Xterra con tampón que contenía 3,12 g de fosfato de sodio en 800 ml de agua y 200 ml de acetonitrilo con el pH ajustado a 2,4 usando ácido orto-fosfórico. Se eluyeron los componentes del ensayo usando tampón A a un caudal de 2,5 ml/min. Se inyectaron 20 µl de muestra y se detectaron los componentes a 260 nm. Los tiempos de retención de los compuestos en estas condiciones son de 0,65 min y 1,3 min para fenilacetildesacetil-7-ACA y fenilacetil-7-ADCA, respectivamente.

Expresión de proteína a gran escala:

Se preparó el medio de fermentación como se describe por Lee SY. y Chang HN., *Biotechnology Letters*, 15, 971-974, 1993.

Se transfirió un inóculo de semilla al 4-5 % crecido durante 6-8 horas en matraz agitado en medio R/2 a un fermentador y se cultivó a 25 °C con agitación para mantener el oxígeno disuelto al menos al 40 %. Tras el agotamiento de la glucosa residente, se inició la alimentación para mantener una glucosa residual de 0,1 g/l. Al alcanzar la DO_{600 nm} aproximadamente de 40 a 150, se añadió IPTG 0,1 mM para inducir la producción de proteína. Se cultivaron adicionalmente las células durante 12-18 horas después de la inducción y entonces se recolectaron.

45 **Lisis celular:**

Se tomó el sedimento celular (20 g) de la fermentación a alta densidad celular y se resuspendió en 200 ml de tampón de resuspensión (Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM y 10 % de glicerol). Después de completar la resuspensión, se añadieron 200 µl de lisozima 100 mg/ml y se agitó durante 20 min. Se lisaron las células por sonicación durante 15 min, como alternativa pueden lisarse usando un homogeneizador.

50 **Elaboración enzimática:**

Se elabora la enzima por uno cualquiera de los procedimientos siguientes o combinación de los procedimientos siguientes.

a) Purificación en columna:

Se centrifugó el lisado celular a 13000 rpm durante 15 min, se retuvo el sobrenadante y se desechó el sedimento. Se purificó en columna el sobrenadante como a continuación usando el purificador AKTA de GE healthcare.

Columna: XK26/20

5 Matriz: DE52 whatmann o cualquier matriz con dietilaminoetilo (DEAE) o grupo funcional de intercambio aniónico débil.

Caudal: 5 m/min

Tampón de inicio: Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM y 10 % de glicerol

Tampón de elución: Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM y 10 % de glicerol+ NaCl 0,4 M

10 Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de agua y se equilibró entonces con 10 volúmenes de columna de tampón de inicio. Se cargó la muestra en la columna y se lavó con el tampón de inicio hasta que el flujo a través no mostró absorbancia de UV. Se eluyó la proteína con el tampón de elución.

b) Precipitación de proteína por PEI

Procedimiento 1: Se añadió al lisado PEI al 0,3 % (v/p) y se agitó durante 60 min. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4000 rpm, se retuvo el sedimento y se desechó el sobrenadante.

15 **Procedimiento 2:** Se centrifugó el lisado celular a 13000 rpm durante 15 min, se retuvo el sobrenadante y se desechó el sedimento. Se añadió al sobrenadante PEI al 0,3 % (v/p) y se agitó durante 60 min. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4000 rpm, se retuvo el sedimento y se desechó el sobrenadante.

20 **Procedimiento 3:** Se centrifugó el lisado celular a 13000 rpm durante 15 min, se retuvo el sobrenadante y se desechó el sedimento. Se añadió al sobrenadante PEI al 0,3 % (v/p) y se agitó durante 60 min. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4000 rpm, se retuvo el sedimento y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en tampón de elución (Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM y 10 % de glicerol+ NaCl 0,4 M) durante 15 min y entonces se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se retuvo el sobrenadante para la reacción.

Fraccionamiento con sulfato de amonio

25 Se tomó el sedimento celular (20 g), se resuspendió en 200 ml de tampón de resuspensión (Tris 50 mM pH 8,0, DTT 1 mM y 10 % de glicerol). Después de completar la resuspensión, se añadieron 200 µl de lisozima madre 100 mg/ml y se agitó durante 20 min. Se sometió a sonicación la muestra (nivel de potencia 0,5 y amplitud de 60 %) durante 15 min. Se añadió PEI al 0,1 % y se agitó durante 60 min. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4000 rpm, se tomó el sobrenadante y se desechó el sedimento. Se añadió sulfato de amonio (60 % p/p) al sobrenadante y se agitó durante una noche. Se centrifugó entonces la solución a 13000 rpm durante 10 min. Se usó el sedimento con la proteína activa para reacción adicional. Se llevaron a cabo todas las etapas anteriores a 4 °C.

Liofilización de proteína:

35 Se resuspendieron 20 g de sedimento en 100 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 7,0 con 100 µl de lisozima (100 mg/ml). Se lisó la suspensión celular por sonicación. Se centrifugó la solución a 10.000 rpm durante 30-40 min y se tomó el sobrenadante. Se añadieron a este 2,5 ml de PEI (de la solución madre al 10 %) y se agitó durante 2 horas. Se centrifugó al solución a 10.000 rpm durante 15 min, se añadió al sobrenadante PEG 6000 al 1 % y se agitó durante 2 horas. Se centrifugó la solución a 10000 rpm durante 15 min y se añadió al sobrenadante PEG 6000 al 1 % y se agitó durante 10-30 min. Se congeló la muestra y se fijó para liofilización. Se obtuvo proteína liofilizada en forma de sólido fluido en 20-25 horas.

Monitorización de la reacción:

40 Se llevó a cabo la reacción de hidroxilación usando 360 mg de fenilacetil-7-ADCA, 239 mg de ácido α-cetoglutárico, 95 mg de ácido ascórbico y 2,64 mg de sulfato ferroso, usando 120 mg de la enzima a pH 7,3 en un volumen de reacción de 20 ml con agitación constante a 15 °C durante 300 minutos. Se monitorizó la reacción por HPLC tomando 10 µl de la mezcla de reacción, se inactivó con 20 µl de metanol y 90 µl de agua, se centrifugó y se analizó el sobrenadante. Se denota el punto final cuando la reacción llega a un 95-97 % de terminación.

45 Tabla 1: Detalles de los mutantes que muestran una hidroxilación mejorada

Se comparó la actividad relativa de cada mutante con la actividad de la enzima de tipo silvestre (Fig. 1) que se fija como 100 %.

ES 2 643 476 T3

Nº de muestra	ID de mutante	Nº de mutaciones	Mutaciones	Mejora en veces
1	G3	5	P72L, T90A, V206I, A210V, A311V	260 %
2	G56	5	P7L, P72L, T90A, A237V, A311V	280 %
3	G71	4	T51M, P72L, T90A, A311V	300 %
4	G73	4	A40V, P72L, T90A, A311V	320 %
5	G74	4	P72L, T90A, A237V, A311V	340 %
6	TMD 3G05	4	P72L, T90A, M233I, A311V	400 %
7	TMD 1A12	4	P72L, T90A, E258K, A311V	400 %
8	TMD 9B07	4	P72L, T90A, F195L, A311V	410 %
9	TMD 9B09	4	P72L, T90A, R250L, A311V	380 %
10	TMD 10F11	4	P72L, T90A, V226I, A311V	380 %
11	G3Q	6	P72L, T90A, V206I, A210V, T273A, A311V	360 %
12	G56A	6	P7L, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V	360 %
13	G56B	5	P7L, P72L, T90A, T273A, A311V	340 %
14	G56C	5	P72L, T90A, A237V, T273A, A311V	280 %
15	G71Q	5	T51M, P72L, T90A, T273A, A311V	360 %
16	G73Q	5	A40V, P72L, T90A, T273A, A311V	360 %
17	G74Q-TG	5	P72L, T90G, A237V, T273A, A311V	340 %
18	G71-G74Q	6	T51M, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V	340 %
19	G73-G74Q	6	A40V, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V	320 %
20	G71-G40Q	6	T51M, P72L, T90A, M229I, T273A, A311V	420 %
21	G73-G40Q / M	6	A40V, P72L, T90A, M229I, T273A, A311V	340 %
22	G134	7	A40V, P72L, T90A, M229I, F267L, T273A, A311V	620 %
23	134 + 177V	8	A40V, P72L, T90A, A177V, M229I, F267L, T273A, A311V	610 %
24	134 + 195L	8	A40V, P72L, T90A, F195L, M229I, F267L, T273A, A311V	500 %
25	G148	8	A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M229I, T273A, A311V	620 %
26	G151	7	A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, T273A, A311V	620 %
27	G169	8	A40V, P72L, T90A, Q209E, M229I, V249I, T273A, A311V	620 %
28	G179	7	A40V, P72L, T90A, Q209E, M229I, T273A, A311V	620 %

ES 2 643 476 T3

29	G182	10	A40V, P72L, E82D, T90A, Q209E, M229I, L236V, V249I, T273A, A311V	620 %
30	M+V221-A	7	A40V, P72L, T90A, V221P, M229I, T273A, A311V	530 %
31	M+V221-B	7	A40V, P72L, T90A, V221H, M229I, T273A, A311V	530 %
32	M+ R182	7	A40V, P72L, T90A, R182S, M229I, T273A, A311V	580 %
33	M 38A11	7	A40V, P72L, T90A, A177V, M229I, T273A, A311V	620 %
34	M 38B10	7	A40V, P72L, T90A, V171M, M229I, T273A, A311V	620 %
35	M 2A11B	7	A40V, P72L, T90A, M229I, S260G, T273A, A311V	660 %
36	M 78C12	7	A40V, P72L, T90A, M229I, S251F, T273A, A311V	750 %
37	M+195	7	A40V, P72L, T90A, F195L, M229I, T273A, A311V	630 %
38	M+226	7	A40V, P72L, T90A, V226I, M229I, T273A, A311V	560 %
39	M+250	7	A40V, P72L, T90A, M229I, R250L, T273A, A311V	560 %
40	M+258	7	A40V, P72L, T90A, M229I, E258K, T273A, A311V	380 %
41	M+233I	7	A40V, P72L, T90A, M229I, M233I, T273A, A311V	360 %
42	M195L + 226V	8	A40V, P72L, T90A, F195L, V226I, M229I, T273A, A311V	540 %
43	M195L+250R	8	A40V, P72L, T90A, F195L, R250L, M229I, T273A, A311V	380 %
44	M226V +250R	8	A40V, P72L, T90A, V226I, M229I, R250L, T273A, A311V	340 %
45	P	9	A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M229I, F267L, T273A, A311V	500 %
46	P+233I	10	A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M233I, M229I, F267L, T273A, A311V	380 %
47	R	8	A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, F267L, T273A, A311V	800 %
48	R+195L	9	A40V, P72L, T90A, V171L, F195L, M229I, F267L, T273A, A311V	680 %
49	R+ 233I	9	A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, M233I, F267L, T273A, A311V	560 %
50	R+258E	9	A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, E258K, F267L, T273A, A311V	720 %
51	S	9	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	1000 %

ES 2 643 476 T3

52	G234	10	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V, N313D	1200 %
53	G234 +177V	11	A40V, P72L, T90A, V171L, A177V, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V, N313D	800%
54	G248	10	A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	1300 %
55	G283	11	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, A280S, T273A, A311V,	1300 %
56	G295	10	A40V, M53L, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311M	1200 %
57	G304	10	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, V226I, M229I, F267L, T273A, A311V	1100 %
58	G315	11	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V	1500 %
59	G325	8	A40V, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	1200 %
60	G344	9	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311M	1200 %
61	G350	11	A40V, P72L, T90A, T96S, I149T, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	1200 %
62	S+ 177V	10	A40V, P72L, T90A, V171L, A177V, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	900%
63	S+ 251F	10	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, S251F, F267L, T273A, A311V	1000 %
64	S +260G	10	A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, S260G, F267L, T273A, A311V	1000 %
65	T	12	A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V	1700 %
66	G248 + G283	12	A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, T273A, A280S, A311V	1200 %
67	G350+ G283	12	A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, T273A, A280S, A311V	1300 %
68	G350 + G315	12	A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V	1500 %
69	G350 + S	10	A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	1200 %
70	GOS3	10	A40V, P72L, T90A, G108D, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V	1900 %

5 La tabla anterior indica claramente que la hidroxilasa mutada de la presente invención tiene una actividad de hidroxilación significativamente mayor hacia el compuesto de fórmula (II) que el correspondiente tipo silvestre. Como la hidroxilasa mutada de la presente invención tiene una actividad más de 10 veces mayor que la hidroxilasa nativa, la presente invención proporciona bioprocedimientos para la preparación del compuesto de fórmula (I) a escala de fabricación a bajo coste. Debido a la identificación de la hidroxilasa mutada, la presente invención proporciona un procedimiento verde ecológico para la preparación de una serie de fármacos/intermedios de cefalosporina.

Figura 1: Alineamiento de cefF (SEQ ID NO 1)

ES 2 643 476 T3

MADTPVPIFNLAALREGADQEKFRECVTGMGVFYL TGYGAGDKDHRLATDTAMDFFANGT
EAEKAAVTTDVPTMRRGYSALAEESTAQVTRTGSYTDYSMSFSMIGSNVFPSPERFVW
EPRRMAPHYDLSIITFIHQTPCANGFVSLQAEIGGELVSLPVVEDAVVVMCGAMAPLATQ
GALPAPRHHVRSPGAGMREGSDRTSSVFFLRPTTDFSFVAKARSYGLAVDLDMETATFG
DWIGTNYVTMHAKNEPQAG

Figura 2: Secuencia nucleotídica y su correspondiente secuencia aminoácídica (SEQ ID NO 1)

1 atggcggacacgcccgtaccgatcttcaacctcggcgcactgcggggaagggcgccgatcag
M A D T P V P I F N L A A L R E G A D Q
61 gagaagttccgcgagtgcgtagaccgggatgggggtcttctacctcaccgggtacggcgcc
E K F R E C V T G M G V F Y L T G Y G A
121 ggggataaggaccaccggctggccacggacacggcgatggacttcttcgcaacggcacc
G D K D H R L A T D T A M D F F A N G T
181 gaggccgagaagggcgccgtgaccacggacgtccccgaccatgcgggcgggctactccgcg
E A E K A A V T T D V P T M R R G Y S A
241 ctggaggccgagagcaccgcccaggtgaccaggaccgggttcctacacggactactcggatg
L E A E S T A Q V T R T G S Y T D Y S M
301 tccttctccatgggcatctcgggcaacgtcttcccctcgccggagttcggagcgggtgtgg
S F S M G I S G N V F P S P E F E R V W
361 acggagtacttcgacaagctctacgcgggcccgaggagacggcgcggtggtgctgacc
T E Y F D K L Y A A A Q E T A R L V L T
421 gcgagcggcggtatgacgcgagatcgctcggaagcctggacgagctgctggacgcccagc
A S G G Y D A E I V G S L D E L L D A D
481 cccgtgctgcggtgctggtacttccccgaggtgcccgagcaccgggtccgcccagcagcag
P V L R L R Y F P E V P E H R S A E H E
541 ccgcccggatggccccgactacgacctgctgatcatcaccttcatccaccagacgccc
P R R M A P H Y D L S I I T F I H Q T P
601 tgcgccaacggcttcgctcagcctccaggccgagatcgggcggaactggtgagcctgccc
C A N G F V S L Q A E I G G E L V S L P
661 gtcgtggaggacgcccgtcgtcgtgatgtgcggcgcgatggccccgctggcgaccagggc
V V E D A V V V M C G A M A P L A T Q G
721 gcgctgcccgcgccccggcaccacgtccgggtcccccgcgccggtatgcgcgagggcagc
A L P A P R H H V R S P G A G M R E G S
781 gaccgcacgtcagcgtcttcttctcgtcgccccacgaccgacttctcgttctcgggtggcc
D R T S S V F F L R P T T D F S F S V A
841 aaggcccgcagctacggcctcggctcgcacctcgacatggagacggccacctcggcgac
K A R S Y G L A V D L D M E T A T F G D
901 tggatcggcaccactacgtcaccatgcacgcaagaacgagccgcaggccgga 954
W I G T N Y V T M H A K N E P Q A G

REIVINDICACIONES

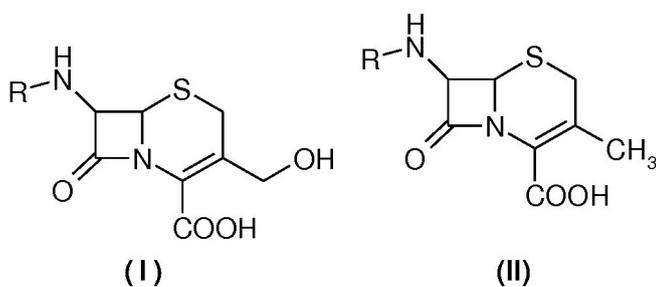
1.- Una hidroxilasa mutante que porta sustituciones aminoacídicas en las posiciones de residuo de la hidroxilasa de tipo silvestre de secuencia SEQ ID NO: 1 seleccionadas de:

- i) P72L, T90A, V206I, A210V, A311V
- 5 ii) P7L, P72L, T90A, A237V, A311V
- iii) T51M, P72L, T90A, A311V
- iv) A40V, P72L, T90A, A311V
- v) P72L, T90A, A237V, A311V
- vi) P72L, T90A, M233I, A311V
- 10 vii) P72L, T90A, E258K, A311V
- viii) P72L, T90A, F195L, A311V
- ix) P72L, T90A, R250L, A311V
- x) P72L, T90A, V226I, A311V
- xi) P72L, T90A, V206I, A210V, T273A, A311V
- 15 xii) P7L, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- xiii) P7L, P72L, T90A, T273A, A311V
- xiv) P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- xv) T51M, P72L, T90A, T273A, A311V
- xvi) A40V, P72L, T90A, T273A, A311V
- 20 xvii) P72L, T90G, A237V, T273A, A311V
- xviii) T51M, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- xix) A40V, P72L, T90A, A237V, T273A, A311V
- xx) T51M, P72L, T90A, M229I, T273A, A311V
- xxi) A40V, P72L, T90A, M229I, T273A, A311V
- 25 xxii) A40V, P72L, T90A, M229I, F267L, T273A, A311V
- xxiii) A40V, P72L, T90A, A177V, M229I, F267L, T273A, A311V
- xxiv) A40V, P72L, T90A, F195L, M229I, F267L, T273A, A311V
- xxv) A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M229I, T273A, A311V
- xxvi) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, T273A, A311V
- 30 xxvii) A40V, P72L, T90A, Q209E, M229I, V249I, T273A, A311V
- xxviii) A40V, P72L, T90A, Q209E, M229I, T273A, A311V
- xxix) A40V, P72L, E82D, T90A, Q209E, M229I, L236V, V249I, T273A, A311V
- xxx) A40V, P72L, T90A, V221P, M229I, T273A, A311V
- xxxi) A40V, P72L, T90A, V221H, M229I, T273A, A311V
- 35 xxxii) A40V, P72L, T90A, R182S, M229I, T273A, A311V
- xxxiii) A40V, P72L, T90A, A177V, M229I, T273A, A311V
- xxxiv) A40V, P72L, T90A, V171M, M229I, T273A, A311V

ES 2 643 476 T3

- xxxv) A40V, P72L, T90A, M229I, S260G, T273A, A311V
xxxvi) A40V, P72L, T90A, M229I, S251F, T273A, A311V
xxxvii) A40V, P72L, T90A, F195L, M229I, T273A, A311V
xxxviii) A40V, P72L, T90A, V226I, M229I, T273A, A311V
5 xxxix) A40V, P72L, T90A, M229I, R250L, T273A, A311V
xl) A40V, P72L, T90A, M229I, E258K, T273A, A311V
xli) A40V, P72L, T90A, M229I, M233I, T273A, A311V
xlii) A40V, P72L, T90A, F195L, V226I, M229I, T273A, A311V
xliii) A40V, P72L, T90A, F195L, R250L, M229I, T273A, A311V
10 xliv) A40V, P72L, T90A, V226I, M229I, R250L, T273A, A311V
xlv) A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M229I, F267L, T273A, A311V
xlvi) A40V, P72L, T90A, M184I, I193V, M233I, M229I, F267L, T273A, A311V
xlvii) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, F267L, T273A, A311V
xlviii) A40V, P72L, T90A, V171L, F195L, M229I, F267L, T273A, A311V
15 xlix) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, M233I, F267L, T273A, A311V
l) A40V, P72L, T90A, V171L, M229I, E258K, F267L, T273A, A311V
li) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
lii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V, N313D
liii) A40V, P72L, T90A, V171L, A177V, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V, N313D
20 liv) A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
lv) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, A280S, T273A, A311V,
lvi) A40V, M53L, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311M
lvii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, V226I, M229I, F267L, T273A, A311V
lviii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V
25 lix) A40V, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
lx) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311M
lxi) A40V, P72L, T90A, T96S, I149T, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
lxii) A40V, P72L, T90A, V171L, A177V, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
lxiii) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, S251F, F267L, T273A, A311V
30 lxiv) A40V, P72L, T90A, V171L, R182W, M229I, S260G, F267L, T273A, A311V
lxv) A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V
lxvi) A40V, P72L, T90A, R91G, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, T273A, A280S, A311V
lxvii) A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, G255D, F267L, T273A, A280S, A311V
lxviii) A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, A241V, F267L, T273A, V307A, A311V
35 lxix) A40V, P72L, T90A, T96S, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V
lxx) A40V, P72L, T90A, G108D, V171L, R182W, M229I, F267L, T273A, A311V.

- 2.- Una molécula de ácido nucleico que codifica la hidroxilasa mutante de la reivindicación 1.
- 3.- Un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2.
- 4.- El microorganismo portador del vector recombinante de la reivindicación 3, capaz de expresar el gen.
- 5.- Un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) que comprende hacer reaccionar el compuesto de fórmula (II) con la enzima reivindicada en la reivindicación 1 en presencia de ácido α -cetoglutarico, ácido ascórbico y sulfato ferroso en un medio acuoso a una temperatura de entre 5 y 25 °C con pH de 6 a 8:



en las que R representa hidrógeno, fenilacetilo, fenoxiacetilo, aminoadipoilo y glutarilo.

Figura 1: Alineamiento de *ceff* (SEQ ID NO 1)

MADTPVPIFNLAALREGADQEKFRECVTGMGVFYLTGYGAGDKDHRLATDTAMDFFANGT
 EA EKA AVTTDVPTMRRGYSALAE STAQVTRTGSYTDYSMSFSMGI SGNVFPSP EFERVW
 TEYFDKLYAAAQETARLVLTASGGYDAEIVGSLDELLDADPVLRLRYFPEVPEHRS AEHE
 PRRMAPHYDLSIITFIHQTPCANGFVSLQAEIGGELVSLPVVEDAVVVMCGAMAPLATQG
 ALPAPRHHVRSPGAGMREGSDRTSSVFFLRPTTDFSFSAKARSYGLAVDLDMETATFGD
 WIGTNYVTMHAKNEPQAG

Figura 2: Secuencia nucleotídica y su correspondiente secuencia aminoacídica (SEQ ID NO 1)

1 atggcggacacgcccgtaccgatcttcaacctcgcgcactgcgggaaggcgcggatcag
 M A D T P V P I F N L A A L R E G A D Q
 61 gagaagttccgcgagtgcgtgaccgggatgggggtcttctacctcaccgggtacggcgcc
 E K F R E C V T G M G V F Y L T G Y G A
 121 ggggataaggaccaccggctggccacggacacggcgatggacttcttcgcgaacggcacc
 G D K D H R L A T D T A M D F F A N G T
 181 gaggcgagaaggcggcgtgaccacggacgtcccgaccatgcggcgcggtactccgcg
 E A E K A A V T T D V P T M R R G Y S A
 241 ctggaggccgagagcaccgccagggtgaccaggaccggttcctacacggactactcgatg
 L E A E S T A Q V T R T G S Y T D Y S M
 301 tccttctccatgggcatctcgggcaacgtcttcccctcgcggagttcgagcgggtgtgg
 S F S M G I S G N V F P S P E F E R V W
 361 accggagtacttcgacaagctctacgcggcggcccaggagacggcgcggctggtgctgacc
 T E Y F D K L Y A A A Q E T A R L V L T
 421 gcgagcggcggctatgacgcggagatcgtcggaagcctggacgagctgctggacgccgac
 A S G G Y D A E I V G S L D E L L D A D
 481 cccgtgctgcccgtgcggtacttccccgaggtgcccgagcaccggctccgcccagcagcag
 P V L R L R Y F P E V P E H R S A E H E
 541 cgcgcgccggatggccccgcaactacgacctgctgatcatcaccttcatccaccagacgcog
 P R R M A P H Y D L S I I T F I H Q T P
 601 tgccccaacggcttcgctcagcctccaggccgagatcggcggcgaaactgggtgagcctgccc
 C A N G F V S L Q A E I G G E L V S L P
 661 gtcgtggaggacgcccgtcgtcgtgatgtgcggcgcgatggccccgctggcgaccaggcc
 V V E D A V V V M C G A M A P L A T Q G
 721 gcgctgcccgcgccccggcaccacgtccgggtccccggcgccgggtatgcgcgagggcagc
 A L P A P R H V R S P G A G M R E G S
 781 gaccgcacgtcgagcgtcttcttctcgcgccccacgaccgaacttctcgttctcggtgccc
 D R T S S V F F L R P T T D F S F S V A
 841 aaggcccgcagctacggcctcgcgctcgacctcgacatggagacggccaccttcggcgac
 K A R S Y G L A V D L D M E T A T F G D
 901 tggatcggcaccactacgtcaccatgcacgcgaagaacgagccgcaggccgga 954
 W I G T N Y V T M H A K N E P Q A G