

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 443**

51 Int. Cl.:

C12R 1/19	(2006.01)
C08B 37/08	(2006.01)
C08B 37/00	(2006.01)
A61K 31/737	(2006.01)
C08L 5/08	(2006.01)
C12P 19/04	(2006.01)
C12P 19/26	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2011 PCT/EP2011/059069**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004063**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11722468 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2591127**

54 Título: **Producción biotecnológica de condroitina**

30 Prioridad:

15.07.2010 IT MI20101300
09.07.2010 IT MI20101264

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2017

73 Titular/es:

GNOSIS S.P.A. (100.0%)
Piazza del Carmine 4
20121 Milano, IT

72 Inventor/es:

TRILLI, ANTONIO;
BUSIELLO, IMMACOLATA;
DALY, SIMONA y
BAGATIN, FRANCESCA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 644 443 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 biotecnológica de condroitina.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo microorganismo recombinante que produce condroitina y a un procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina.

10 En la presente invención, el término condroitina se refiere a un polisacárido lineal definido como un glucosaminoglicano lineal constituido por residuos alternos de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) unidos mediante enlaces β 1-3 (GlcUA \rightarrow GalNAc) y β 1-4 (GalNAc \rightarrow GlcUA).

Antecedentes de la invención

15 El condroitín sulfato es un glucosaminoglicano en el que ácido glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) se unen lineal y alternativamente mediante enlace β 1-3 y enlace β 1-4, respectivamente, para formar una cadena polisacárida lineal que está sulfatada en grados variables en sus residuos de GalNAc.

20 Se encuentra presente en animales, en cartílagos y tejido conectivo, y desempeña un papel importante en la adhesión celular, la regeneración de los tejidos, el crecimiento de los nervios y similares.

La producción de condroitina a partir de fuentes no animales es una etapa importante y deseable hacia la producción de condroitín sulfato de origen no animal.

25 La literatura de patentes disponible describe varios procedimientos para la producción de condroitina de origen no animal.

30 Además, se han clonado y secuenciado varios genes de condroitina sintasa derivados tanto de animales como de microorganismos.

Se ha proporcionado un procedimiento para la producción de condroitina mediante la utilización de una bacteria *Bacillus* Gram-positiva recombinante en la que se ha introducido un gen de condroitina sintasa derivado de *Pasteurella multocida* (documento US 2007/0281342 A1).

35 Una invención adicional describe un procedimiento para producir condroitina mediante la introducción de los genes *kfoC* y *kfoA*, derivados de *Escherichia coli* O5:K4:H4 en una bacteria productora de UDP-ácido glucurónico (documento nº WO2008/133350), en la que dicho microorganismo no presenta de manera natural el gen *kfoE*.

40 Otra invención describe una síntesis *in vitro* de condroitina en un sistema enzimático que comprende tanto la condroitina sintasa de *Escherichia coli* O5:K4:H4 y los precursores de la reacción (documento US 2009/0263867 A1).

45 Es conocido que *Escherichia coli* O5:K4:H4 es capaz de producir un polisacárido capsular (el polisacárido K4) con la misma estructura esquelética que la condroitina, en la que se unen residuos de fructosa a los residuos de GlcUA (ver, por ejemplo, N. Volpi, Glycoconj. J. 25:451-457, 2008). Por lo tanto, el polisacárido K4 consta de una unidad trisacárido repetida que comprende una fracción ácido D-glucurónico (GlcUA) y una fracción N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) unidas mediante un enlace β 1-3 (GlcUA \rightarrow GalNAc) y un residuo de fructosa unido al grupo hidroxilo de C3 del residuo GlcUA. De esta manera, los residuos de fructosa constituyen ramas del polisacárido lineal resultante.

50 La eliminación de los residuos de fructosa se ha conseguido mediante el tratamiento hidrolítico bajo condiciones ácidas (N. Volpi, Electrophoresis 25:692-696, 2004). Análogamente, la eliminación de las unidades de fructosa de la condroitina producida en una cepa *E. coli* K4 mediante tratamiento ácido también se da a conocer en Volpi et al., Glycoconjugate Journal 25(5):451-457, 2007.

55 Aunque el complejo génico del antígeno capsular de *Escherichia coli* O5:K4:H4, así como las rutas metabólicas que conducen a los azúcares que constituyen el polisacárido lineal K4, han sido estudiados ampliamente, la actividad de glucosil-transferasa responsable de la adición de las fracciones fructosa al polisacárido lineal para proporcionar el polisacárido K4 hasta el momento no han sido identificadas.

60 La nueva característica de la presente invención es la producción directa de condroitina de alto peso molecular por un microorganismo recombinante obtenido mediante la inactivación de un gen codificante de un enzima responsable de la adición de residuos de fructosa al esqueleto de condroitina, evitando de esta manera la necesidad de someter el polisacárido K4 a la eliminación hidrolítica de los residuos de fructosa unidos a las

65

fracciones de GlcUA, obteniendo condroitina.

Descripción detallada de la invención

5 En la presente memoria se da a conocer un microorganismo recombinante que produce condroitina, definido como un glucosaminoglicano lineal que consta de residuos alternos de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) unidos mediante enlace β 1-3 y enlace β 1-4, respectivamente, caracterizado porque en dicho microorganismo un gen codificante de un enzima responsable de la adición de residuos de fructosa al esqueleto de condroitina se encuentra inactivado.

10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante que produce condroitina, definido como un glucosaminoglicano lineal constituido por residuos alternantes de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) unidos mediante enlaces β 1-3 (GlcUA \rightarrow GalNAc) y β 1-4 (GalNAc \rightarrow GlcUA), caracterizado porque dicho microorganismo se deriva de un microorganismo perteneciente al grupo del antígeno K y porque en dicho microorganismo el gen *kfoE* originalmente presente que codifica un enzima responsable de la adición de residuos de fructosa al esqueleto lineal de condroitina resulta inactivado por supresión o sustitución total o parcial de dicho gen o por la disrupción mediante inserción de una secuencia adicional de nucleótidos y en el que dicho gen *kfoE* codifica una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 20 (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2,
- (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 modificada por supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de fructosil-transferasa, y
- 25 (C) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 50% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y que presenta una actividad de fructosil-transferasa.

30 Por lo tanto, el microorganismo recombinante productor de condroitina de la presente invención se caracteriza porque dicho microorganismo se obtiene sometiendo un gen originalmente presente en el mismo, que codifica una proteína responsable de la adición de residuos de fructosa al esqueleto lineal de condroitina, a inactivación, incluyendo dicha inactivación la supresión o sustitución total o parcial de dicho gen o la disrupción por inserción de una secuencia adicional de nucleótidos.

35 Preferentemente, el microorganismo recombinante de la presente invención obtenido mediante inactivación del gen codificante de una proteína con una actividad de fructosil-transferasa se deriva de una bacteria que pertenece a la especie *Escherichia coli* y preferentemente pertenece al grupo 2 del antígeno K que incluye serotipos bien conocidos, tales como K1, K5, K7 y K12.

40 Preferentemente, el microorganismo recombinante según la presente invención es un microorganismo en el que el gen inactivado es el gen *kfoE*, un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en (a), (b) y (c) a continuación:

- 45 (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1,
- (b) un ADN que se hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC ID nº 1 y codifica una proteína que presenta actividad de fructosil-transferasa, y
- 50 (c) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una homología de por lo menos 50% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1 y que codifica una proteína con una actividad de fructosil-transferasa.

55 Preferentemente, en el microorganismo recombinante de la presente invención el gen *kfoE* se encuentra inactivado mediante la sustitución total o parcial del mismo por un casete de resistencia a la canamicina y su posterior eliminación, resultando en la supresión total o parcial del gen *kfoE*.

60 Preferentemente, el microorganismo recombinante de la presente invención se deriva de una bacteria perteneciente a un género seleccionado de entre *Escherichia*, *Haemophilus*, *Campylobacter*, *Gloeocapsa* y *Vibrio*, más preferentemente *Escherichia coli*, todavía más preferentemente dicho microorganismo se deriva de un serotipo de la especie *Escherichia coli* perteneciente al grupo 2 del antígeno k.

65 Según una forma de realización representativa de la presente invención, el microorganismo recombinante con capacidad de producir condroitina se deriva de *Escherichia coli* O5:K4:H4 y puede utilizarse cualquiera de los microorganismos pertenecientes al grupo del antígeno K, con independencia de si comparte cualquier homología génica con *Escherichia coli* O5:K4:H4. Entre los ejemplos de dichos microorganismos se incluyen las bacterias

5 pertenecientes al género *Haemophilus*, tal como *H. influenzae* (Branefors-Helander P., Carbohydr. Res. 88, 15 de enero de 1981), *Campylobacter*, tal como *C. jejuni* (McNally DJ, Jarrell HC, Li J, Khieu NH, Vinogradov E, Szymanski CM, Brisson JR., FEBS J. 272(17):4407-4422, sept. de 2005), *Gloeocapsa*, tal como *G. gelatinosa* (Raungsomboon S, Chidthaisong A, Bunnag B, Inthorn D, Harvey NW., Water Res. 40(20):3759-3766, dic. de 2006) y *Vibrio*, tal como *V. cholerae* (Knirel YA, Widmalm G, Senchenkova SN, Jansson PE, Weintraub A, Eur. J. Biochem. 247:402-410, julio de 1997).

10 Más preferentemente, la bacteria de la que se deriva el microorganismo recombinante de la presente invención productora de condroitina es *Escherichia coli* serotipo O5:K4:H4, que contiene el gen *kfoE*, codificante de una proteína con una actividad de fructosil-transferasa.

15 El gen *kfoE* es conocido que está situado dentro del complejo génico del antígeno K4 de *E. coli* (GenBank AB079602) que contiene genes que los inventores han encontrado que presentan una homología significativa respecto a genes de otros microorganismos que es probable que participen en la producción de la cápsula bacteriana (T. Ninomiya, N.Sugiura, A. Tawada, K.Sugimoto, H. Watanabe and K. Kimata, J. Biol. Chem. 277(24): 21567-75, 14 de junio de 2002).

20 La bacteria más preferentemente utilizada para obtener el microorganismo recombinante de la presente invención es *Escherichia coli* O5:K4:H4 cepa U1-41, disponible de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos), bajo el número de acceso ATCC23502.

Preferentemente, el microorganismo recombinante de la presente invención es *Escherichia coli* DSM23578 o *Escherichia coli* DSM23644, todavía más preferentemente *Escherichia coli* DSM23644.

25 En la presente memoria se da a conocer un microorganismo productor de condroitina, en el que se obtiene la inactivación de *kfoE* mediante la modificación de su secuencia de nucleótidos, tal como mediante la supresión o sustitución, total o parcial, de la secuencia de nucleótidos indicada en (a), (b) o (c), anteriormente.

30 En la presente memoria se da a conocer además un microorganismo en el que se obtiene la inactivación de *kfoE* mediante la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos indicada en (a), (b) o (c), anteriormente.

35 Según un aspecto más preferido de la presente invención, el derivado recombinante de *Escherichia coli* O5:K4:H4 cepa U1-41 (en lo sucesivo denominado *E. coli* K4) se obtiene mediante inactivación del gen *kfoE*, codificante de una fructosil-transferasa putativa, mediante la supresión de nucleótidos.

La presente invención da a conocer cómo la interrupción del gen *kfoE* conduce a la producción directa del polisacárido K4 sin residuos de fructosa, es decir, de condroitina.

40 Según un aspecto preferido adicional de la presente invención, *E. coli* K4 recombinante de la presente invención se obtiene mediante la utilización de un procedimiento para la interrupción de genes cromosómicos en los que los cebadores de PCR proporcionan la homología respecto al gen diana (Datsenko y Wanner, PNAS 97(12):6640-6645, 6 de junio de 2000).

45 La cepa *E. coli* K4 recombinante de la presente invención se ha sometido a la inactivación del gen *kfoE* cromosómico en primer lugar mediante la sustitución de la mayoría de su secuencia de nucleótidos por un gen exógeno de resistencia a la canamicina ("primera modificación genética") y después mediante la supresión del gen insertado utilizando un vector de expresión de FLP recombinasa ("segunda modificación genética").

50 La cepa recombinante *E. coli* K4 obtenida tras la primera modificación genética, denominada *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) fue depositada el 30 de abril de 2010 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, en virtud del Tratado de Budapest, bajo el número de acceso DSM23578.

55 La cepa recombinante *E. coli* K4 obtenidas tras la segunda modificación genética, denominada *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$), fue depositada el 26 de mayo de 2010 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, en virtud del Tratado de Budapest, bajo el número de acceso DSM23644.

60 La inactivación del gen *kfoE* se llevó a cabo mediante 3 transformaciones bacterianas sucesivas en primer lugar con el plásmido de expresión de recombinasa Red (pKD46), en segundo lugar, con un fragmento de ADN derivado de un plásmido de molde (pDK4) modificado convenientemente para proporcionar homología respecto al gen *kfoE* y, en tercer lugar, con el plásmido ayudante que expresa el enzima FLP recombinasa (pCP20).

65 Con el fin de obtener la primera modificación genética de *E. coli* K4, se ha utilizado tanto el plásmido pKD46 (GenBank: AY048746) como el fragmento de ADN lineal.

El plásmido pKD46, utilizado en la primera etapa de transformación de *E. coli* K4, consta de 2.154 nucleótidos del fago lambda y del gen codificante de resistencia a la ampicilina. Este plásmido estimula una tasa incrementada de recombinación al utilizar fragmentos de ADN lineales.

5

El fragmento de ADN lineal utilizado en la posterior transformación de *E. coli* K4 se obtuvo mediante PCR utilizando varias parejas de cebadores que incluían extensiones de homología respecto a tanto el gen *kfoE* como el plásmido de molde pKD4 portador de un casete de resistencia a la canamicina (GenBank: AY 048743).

10

Dicho procedimiento pudo generar un fragmento de ADN lineal portador de un casete de resistencia a la canamicina, con los extremos homólogos 5' y 3' *kfoE* en los extremos del mismo.

15

En una forma de realización de la presente invención, se llevó a cabo la transformación bacteriana mediante electroporación, que se seleccionó debido a su capacidad de generar fácilmente dobles transformantes que pueden recuperarse a partir de placas que contienen tanto ampicilina como canamicina.

20

Sin embargo, aunque la electroporación es la técnica preferida, dicho resultado podría conseguirse mediante cualquier procedimiento conocido de transformación, tal como la transformación con cloruro de calcio o la transformación con dextrano-DEAE.

25

Con el objetivo de verificar la localización correcta de la sustitución de la secuencia de ADN original con el casete de resistencia a la canamicina en los transformantes de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$), se llevaron a cabo varias amplificaciones por PCR, utilizando 2 parejas próximas de cebadores específicos de locus: la primera pareja de cebadores pudo demostrar la formación de una nueva unión entre el extremo 5' remanente de *kfoE* y el gen *kan* insertado, mientras que la segunda pareja de cebadores pudo demostrar la formación de una nueva unión entre el gen *kan* insertado y el extremo 3' remanente de *kfoE*.

30

El plásmido ayudante utilizado para eliminar el casete de resistencia a la canamicina ("segunda modificación genética") fue el plásmido pCP20, portador del gen de FLP recombinasa de levadura y un gen de resistencia a la ampicilina. Tanto el plásmido pKD46 como el plásmido pCP20 son vectores sensibles a la temperatura que fueron posteriormente eliminados de las cepas transformantes de *E. coli* K4 tras el crecimiento a 43°C.

35

Se llevó a cabo un análisis de secuenciación en *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) para confirmar la sustitución del gen *kfoE*, totalmente o en parte, con el casete de resistencia a la canamicina. De manera similar, se llevó a cabo un análisis de secuenciación en *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$) para verificar la posterior supresión del casete de resistencia a la canamicina, resultando en la producción final de la cepa bacteriana con disrupción de *kfoE*.

40

El procedimiento utilizado para la construcción con éxito de un *E. coli* K4 recombinante capaz de producir una variante no glucosilada de un glucosaminoglicano natural resulta de aplicabilidad general y puede aplicarse ventajosamente a otros productos glucosilados en los que resulta deseable evitar dicha glucosilación. En conclusión, se ha desarrollado un procedimiento general para la obtención de microorganismos capaces de producir variantes no glucosiladas de glucosaminoglicanos naturales.

45

Otro objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina, en el que se utiliza un microorganismo recombinante seleccionado de entre *Escherichia coli* DSM23578 y *Escherichia coli* DSM23644, preferentemente se utiliza *Escherichia coli* DSM23644.

50

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina que comprende las etapas siguientes:

55

(1) cultivar en un medio adecuado el microorganismo recombinante de la presente invención, y

(2) recuperar y purificar la condroitina presente en el cultivo microbiano. Preferentemente, en el procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina de la presente invención, el microorganismo recombinante es *Escherichia coli* DSM23578 o *Escherichia coli* DSM23644, todavía más preferentemente el microorganismo recombinante es *Escherichia coli* DSM23644.

60

En la presente memoria se da a conocer que puede utilizarse en la etapa de cultivo cualquier microorganismo recombinante capaz de producir condroitina obtenido según el procedimiento mencionado anteriormente para inactivar un gen codificante de un enzima responsable de la adición de residuos de fructosa a la condroitina.

65

Tal como ya se ha mencionado anteriormente, según una forma de realización preferida de la presente invención, se utiliza una bacteria recombinante obtenida a partir de *E. coli* K4, tal como *E. coli* DSM23644, como el microorganismo recombinante con capacidad de producir directamente condroitina.

70

El procedimiento adoptado para el cultivo de la bacteria *E. coli* DSM23644 es un procedimiento general aplicable

5 al cultivo de los miembros del género *Escherichia*. Dicho procedimiento se basa en la utilización preferida, aunque no exclusiva, de un medio de cultivo que contiene por cada litro: 9,7 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 8 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de citrato sódico $5H_2O$, 0,2 g de $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, 20 g de casaminoácidos, 20 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2 g de glucosa y 10 g de extracto de levadura. Pueden alcanzarse niveles más altos de producción de condroitina mediante la modificación conveniente de la composición del medio basal y/o proporcionando nutrientes adicionales al cultivo mediante complementos del sustrato.

10 Las condiciones de cultivo están definidas para maximizar el crecimiento bacteriano y la producción de condroitina. Típicamente, el cultivo se lleva cabo a temperaturas de entre 25°C y 40°C durante 8 a 72 h.

El sobrenadante se recoge preferentemente mediante centrifugación y se utiliza para la posterior purificación y caracterización de la condroitina producida.

15 Se llevó a cabo la purificación de condroitina según una adaptación de los procedimientos descritos por Rodríguez y Jann (Eur. J. Biochem. 177:117-124, octubre de 1988).

20 Brevemente, el procedimiento adoptado para purificar la condroitina se basa en varias etapas de precipitación partiendo del sobrenadante de cultivo y un secado final bajo vacío. La identidad del producto recuperado puede determinarse mediante varios procedimientos, preferentemente mediante una combinación de procedimientos que proporcionan evidencia de la estructura de la cadena polisacárida y la ausencia de residuos de fructosa.

25 La ausencia de fructosa del producto purificado puede verificarse ventajosamente mediante una hidrólisis ácida del producto, en condiciones que es conocido que liberan la fructosa del polisacárido K4 nativo, seguido de un ensayo específico para cualquier fructosa liberada en consecuencia. Este ensayo demostró consistentemente que el polisacárido recuperado a partir de los cultivos de la bacteria *E. coli* DSM23644 no contenía fructosa, en contraste con el polisacárido K4 nativo obtenido de *Escherichia coli* O5:K4:H4 cepa U1-41, que produjo consistentemente un polisacárido que contenía fructosa en las cantidades esperadas de la fórmula estructural del polisacárido K4.

30 Se obtuvo una confirmación adicional de la identidad del producto recuperado a partir de los cultivos de la bacteria *E. coli* DSM23644 sometiendo el producto a digestión con el enzima condroitinasa ABC, que es conocido que degrada por completo a disacáridos el polisacárido condroitina sin fructosa pero no el polisacárido K4 nativo.

35 En otras palabras, la condroitinasa ABC no puede digerir el polisacárido K4 nativo. Los experimentos de digestión de condroitinasa ABC del producto recuperado a partir de los cultivos de la bacteria *E. coli* DSM23644 rindieron las cantidades del producto disacárido esperadas de una digestión completa, confirmando de esta manera la naturaleza del esqueleto del polisacárido y en particular la ausencia de residuos de fructosa.

40 Según una forma de realización de la presente invención, para confirmar la función de *kfoE* como el gen codificante de la actividad de fructosil-transferasa de K4, se construyó un plásmido recombinante que portaba la secuencia de nucleótidos de *kfoE* de tipo salvaje y se introdujo en la cepa *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$) para mediar en la complementación de la función perdida.

45 Brevemente, se ha amplificado y clonado el gen *kfoE* en el plásmido pTrcHis (Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way PO Box 6482 Carlsbad, California) dentro de los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*. El constructo pTrcHis-*kfoE* ha sido utilizado para transformar mediante electroporación *E. coli* recombinante ($\Delta kfoE$) y los transformantes han sido seleccionados a 37°C en placas que contenían 100 µg/ml de ampicilina.

50 Se han cultivado transformantes de *E. coli* ($\Delta kfoE$) portadores del constructo pTrcHis-*kfoE* y se ha purificado el polisacárido K4 según Rodríguez y Jann (Eur. J. Biochem. 177:117-124, octubre de 1988) y con el fin de cuantificar la fructosa presente en el producto recuperado, se ha determinado la fructosa libre tanto antes como después de la hidrólisis con ácido trifluoroacético 0,2 M durante 1 h a 99°C. La fructosa libre estimada en el ensayo antes y después de la hidrólisis se considera la fructosa unida a la molécula K4 de partida.

55 El producto recuperado del cultivo de *E. coli* DSM23644 transformado por pTrcHis-*kfoE* mostró la presencia de fructosa unida, confirmando que en esta cepa la pérdida de actividad de fructosil-transferasa era complementada por el plásmido.

60 Descripción de los dibujos

La figura 1 representa esquemáticamente las modificaciones genéticas a las que se sometió *Escherichia coli* O5:K4:H4 cepa U1-41 que resultaron en la construcción de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) y *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$):

65 a) fragmento de ADN portador de un casete de resistencia a la canamicina (canamicina), flanqueado por dos secuencias de recombinación de dianas de reconocimiento por flipasa (FRT); el gen de resistencia

a la canamicina se obtuvo a partir del molde de plásmido pKD4 mediante la utilización de los sitios de cebado P1 y P2.

- 5 b) Estructura detallada del complejo génico del antígeno K de *E. coli* O5:K4:H4 cepa U1-41, en el que *kfoD* y *kfoF* son los genes flanqueantes de *kfoE*.
- c) ADN cromosómico de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) que muestra la disrupción del gen *kfoE* mediante la sustitución de un fragmento del ADN original por el gen de resistencia a la canamicina (canamicina).
- 10 d) ADN cromosómico de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$) que muestra la supresión final de la mayor parte del gen *kfoE*.

La figura 2 representa los resultados de la amplificación por PCR realizada en 3 transformantes de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) para verificar la secuencia de las regiones flanqueantes remanentes de *kfoE* en 3' y 5':

- 15 los carriles 1 y 10 muestra un marcador de peso molecular (escala de 1 kb);
- los carriles 2 a 4: producto de PCR del extremo 3' de *kfoE* residual de los 3 transformantes;
- los carriles 6 a 8: producto de PCR del extremo 5' de *kfoE* residual de los 3 transformantes;
- 20 los carriles 5 y 9: producto de PCR de *Escherichia coli* O5:K4:H4 U1-41 obtenida mediante la utilización de las parejas de cebadores 3' y 5', respectivamente.

25 La figura 3 representa un cromatograma del polisacárido producido por *E. coli* DSM23644 que ha sido analizado mediante electroforesis capilar tras la digestión con condroitinasa ABC, en la que se muestra el Δ -disacárido (Δ di-OS) insaturado, típico de la digestión de la condroitina con condroitinasa ABC (pico 8).

La figura 4 representa un espectro de RMN-¹³C de la condroitina producida por *E. coli* DSM23644 obtenida según el ejemplo 3.

30

Ejemplos

Ejemplo 1:

35 Construcción de la cepa *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$)

La construcción del fragmento de ADN lineal (fig. 1a) portador de tanto el gen *kan^R* como los extremos homólogos de *kfoE* se llevó a cabo mediante PCR utilizando el vector pKD4 como molde y los cebadores de PCR siguientes:

40

OL151: atgcttctaataatgtctgttctctatgttcaacaagaatgtgtaggctggagctgcttc (SEC ID n° 3)

OL152: tcatactgcagcctccttaaaaatttcataatctaaatgcacatatgaatatcctct ta (SEC ID n° 4)

45 En cada secuencia oligonucleótido, los primeros 40 nucleótidos proporcionan homología respecto al gen *kfoE* y los restantes 20 nucleótidos proporcionan homología respecto al plásmido molde pKD4 (sitios de cebado P1 y P2).

La PCR se llevó a cabo con 120 ng de ADN molde siguiendo las condiciones siguientes:

50

94°C x 3 min. (94°C x 1 min., 40°C x 1 min., 68°C x 2 min.) x 5 ciclos, (94°C x 1 min., 59°C x 1 min., 68°C x 2 min.) x 30 ciclos, 68°C x 10 min., 4°C x 10 min.

El producto de PCR se purificó del gel y se transformaron las bacterias.

55

Se preparó *Escherichia coli* O5:K4:H4 cepa U1-41 (fig. 1b) y se transformó mediante electroporación con el plásmido pKD46 según Datsenko y Wanner (PNAS 97(12):6640-6645, 6 de junio de 2000) y después se sembró en una placa con medio que contenía ampicilina.

60 Se identificaron y aislaron los transformantes resistentes a ampicilina.

Se verificaron dos transformantes mediante extracción del plásmido y PCR utilizando los cebadores y condiciones siguientes:

65 OL149: ccactcataaatcctcatagag (SEC ID n° 5)

OL150: ccaacttactctgacaacgat (SEC ID n°6)

a 94°C x 3 min. (94°C x 1 min., 43°C x 1 min., 68°C x 2,5 min.) x 30 ciclos, 68°C x 10 min., 4°C x 10 min.

5 El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se identificó un producto con un tamaño de 1.799 pares de bases, completamente concordante con el tamaño de producto esperado.

Uno de los dos transformantes de pKD46 se sometió a una electroporación posterior utilizando el fragmento de ADN que portaba tanto el casete de resistencia a la canamicina como los extremos homólogos de *kfoE*.

10

Se utilizó la selección de placas en medio que contenía tanto ampicilina como canamicina, para aislar recombinantes que portaban la sustitución de la mayor parte de la secuencia de nucleótidos de *kfoE* con el gen de resistencia a la canamicina.

15 Se verificaron tres dobles transformantes mediante amplificación por PCR de tanto la región flanqueante 3' como la 5' de *kfoE*, utilizando los cebadores apropiados siguientes:

OL153: aatccgacggggactgtagatt (SEC ID n°7)

20

OL142: aactgttcgccaggctcaag (SEC ID n°8)

OL143: gcgtttccctgtccagat (SEC ID n°9)

OL154: gctaattgtatgattgccaggt (SEC ID n°10)

25

a 95°C x 5 min. (94°C x 1 min., 47°C x 1 min., 68°C x 2 min.) x 30 ciclos, 68°C x 10 min., 4°C x 10 min.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se identificaron dos productos con un tamaño de 1.773 pares de bases para la amplificación del extremo 3' y de 769 pares de bases para la amplificación del extremo 5' del gen *kfoE*, respectivamente, en completa concordancia con el tamaño esperado de los productos (fig. 2).

30

Con el fin de verificar la orientación del gen de resistencia a la canamicina y para garantizar la correcta dirección de la transcripción génica, se llevó a cabo un análisis adicional de los transformantes mediante análisis de secuenciación de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) (fig. 1c) utilizando los oligonucleótidos siguientes:

35

OL153: aatccgacggggactgtagatt (SEC ID n°7)

OL154: gctaattgtatgattgccaggt (SEC ID n°10)

40

La secuencia de nucleótidos resultantes se identificó mediante SEC ID n° 14.

Ejemplo 2:

45 Construcción de la cepa *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$)

Con el fin de obtener la cepa *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$) sin el casete de resistencia a canamicina y portador de una supresión de la mayor parte del gen *kfoE* con la consiguiente pérdida de función, se llevó a cabo una transformación adicional de la cepa de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE/kan^R$) con el plásmido pCP20.

50

Tras la etapa de electroporación, se seleccionaron los transformantes en medio que contenía ampicilina a 30°C y después se purificaron las colonias.

Los transformantes putativos se cultivaron en placas no selectivas a 43°C y después se sometieron a ensayo para la pérdida de todas las resistencias a antibióticos.

55

Los transformantes de cepa de *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$) se verificaron mediante secuenciación de los extremos remanentes 3' y 5' flanqueantes de *kfoE* (fig. 1d), utilizando los oligonucleótidos siguientes:

OL169: tgagggtgattgttgtaaacttggtg (SEC ID n°11)

OL166: tactgtttctgctgccccgagtt (SEC ID n°12)

60

La secuencia de nucleótidos resultante se identifica como SEC ID n° 13.

65

Ejemplo 3:**Cultivo de *E. coli* DSM23644 y análisis de condroitina**

5 Se llevó a cabo el cultivo de *E. coli* DSM23644 según Rodríguez y Jann (Eur. J. Biochem. 177:117-124, octubre de 1988).

10 Brevemente, se realizó la etapa vegetativa del cultivo partiendo de 0,5 ml de reserva de cultivo descongelada, inoculando un matraz que contenía 20 ml de cultivo de caldo que consiste por litro en: 9,7 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 8 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de citrato sódico $\cdot 5H_2O$, 0,2 g de $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, 20 g de casaminoácidos, 20 g de sulfato amónico, 2 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, incubados a 37°C durante 16 h, bajo agitación a 180 rpm y 2,5 cm de desplazamiento.

15 La siguiente etapa de cultivo se llevó a cabo en cultivo por lotes en un matraz con deflectores de 500 ml que contenía 85 ml de cultivo de caldo tal como se ha indicado anteriormente, se inoculó con 0,05% de cultivo vegetativo preparado tal como se ha indicado anteriormente y se incubó a 37°C durante 48 h bajo agitación a 180 rpm y 25 cm de desplazamiento.

20 Al final de la incubación, se recolectó el cultivo mediante centrifugación y el sobrenadante se sometió a purificación con el fin de aislar y caracterizar la condroitina producida.

La purificación de la condroitina se llevó a cabo según una adaptación de los procedimientos descritos por Rodríguez y Jann (Eur. J. Biochem. 177:117-124, octubre de 1988).

25 Brevemente, el polisacárido se precipitó a partir del sobrenadante de cultivo mediante Cetavlon (bromuro de alquil-trimetil-amonio, CAS nº 7192-88-3), se extrajo con NaOH 0,5 M a 3°C, se neutralizó y posteriormente se purificó mediante 3 ciclos de precipitación con etanol al 80%.

30 Se llevó a cabo una etapa final de purificación con fenol frío al 90%, pH 6,8, para precipitar las proteínas contaminantes, recuperando de esta manera la fase acuosa mediante centrifugación. La condroitina purificada se recuperó a partir de la fase acuosa mediante precipitación con etanol al 80% y secado bajo vacío.

Se utilizaron varios enfoques analíticos para determinar la naturaleza de la condroitina producida.

35 El primer enfoque se basó en la presencia o ausencia de fructosa en el producto que se había recuperado a partir del cultivo tras hidrólisis ácida realizada con ácido trifluoroacético 0,2 M durante 1 h a 99°C.

40 Con el fin de cuantificar la fructosa presente en el producto recuperado, se determinó la fructosa libre tanto antes como después de la hidrólisis. La fructosa se sometió a ensayo enzimáticamente utilizando el kit EnzyPlus de sacarosa/D-glucosa/D-fructosa suministrado por BIOCONTROL (BioControl Systems Inc., 12822 SE 32nd Street Bellevue, WA 98005, Estados Unidos).

45 La diferencia entre la fructosa libre presente tras la hidrólisis y la presente antes de la hidrólisis se consideró que era la fructosa unida a la molécula de K4 inicial.

El producto recuperado del cultivo de *E. coli* DSM23644 no mostró presencia de fructosa unida, confirmando que esta cepa produce un polisacárido sin fructosa.

50 La ausencia de fructosa unida en el polisacárido recuperado a partir de cultivos de *E. coli* DSM23644 tal como se ha indicado anteriormente se confirmó mediante digestión enzimática con condroitinasa ABC. Se demostró además que la condroitina purificada al digerirla con condroitinasa ABC rindió Δ -disacárido insaturado (Δ di-0S) típico de la digestión de la condroitina según se confirma mediante electroforesis capilar (EC), utilizando la técnica de cromatografía electrocinética micelar (CECM) (fig. 3).

55 La confirmación de la estructura de Δ di-0S se obtuvo utilizando el estándar de referencia Δ -disacárido apropiado (elución electroforética equivalente). La determinación cuantitativa de Δ di-0S se obtuvo mediante una curva de calibración externa.

60 Finalmente, el polisacárido condroitina purificado que había sido producido por *E. coli* DSM23644 se caracterizó mediante RMN- ^{13}C (fig. 4).

Dicha técnica demostró que el producto en cuestión era espectralmente idéntico al producto obtenido tras la eliminación de la fructosa del polisacárido K4 nativo mediante hidrólisis ácida.

Ejemplo 4:

Complementación mediada por plásmido de la función de *kfoE*.

5 Con el fin de verificar la función de *kfoE* como gen codificante de la actividad de fructosil-transferasa de K4, se construyó un plásmido recombinante portador de la secuencia de nucleótidos de *kfoE* de tipo salvaje y se introdujo en la cepa *E. coli* K4 ($\Delta kfoE$) para mediar en la complementación de la función perdida.

Se amplificó el gen *kfoE* mediante la utilización de los oligonucleótidos siguientes:

10

OL172: acaacatgttactaataatgtctggttcctatggtc (SEC ID n° 15)

OL173: actggatccttatcactactgcagcctcctta (SEC ID n° 16)

15 Se utilizó el plásmido pTrcHis (4.400 pb – Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, PO Box 6482, Carlsbad, California) para amplificar y purificar en gel el gen *kfoE* (1.569 pb) en sitios de clonación adecuados.

Se sometieron a una reacción de ligación a 25°C durante 15 min. 70 ng de vector pTrcHis digerido con los enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* y 75 ng de gen *kfoE* con extremos digeridos con *PciI/BamHI* compatibles.

20

A continuación, se electroporaron 50 μ l de células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, PO Box 6482, Carlsbad, California) con 5 μ l de mezcla de ligación y se seleccionaron cinco transformantes a 37°C, en placas que contenían 100 μ g/ml de ampicilina.

25 Tras la purificación de las colonias, se extrajo el plásmido construido pTrcHis-*kfoE* y se digirió con el enzima de restricción *Mfe I*, que fue capaz de cortar el constructo de ADN dentro de la secuencia de *kfoE* insertada.

Mediante análisis de electroforesis en gel, 3 de 5 transformantes tras la digestión con *Mfe I* mostraron la longitud esperada de 5.887 pb y el análisis de la secuencia confirmó la inserción correcta del gen *kfoE*.

30

El constructo pTrcHis-*kfoE* verificado se utilizó para transformar mediante electroporación *E. coli* DSM23644 recombinantes y se seleccionaron los transformantes en placas que contenían 100 μ g/ml de ampicilina.

35 Se cultivaron los transformantes seleccionados bajo las condiciones indicadas en el ejemplo 3 y se purificó el polisacárido K4 según Rodríguez y Jann (Eur. J. Biochem. 117:117-124, octubre de 1988).

Con el fin de cuantificar la fructosa presente en el producto recuperado, se determinó la fructosa libre tanto antes como después de la hidrólisis con ácido trifluoroacético 0,2 M durante 1 h a 99°C. La fructosa se sometió a ensayo enzimáticamente utilizando el kit EnzyPlus de sacarosa/D-glucosa/D-fructosa.

40

La diferencia entre la fructosa libre presente después de la hidrólisis y la presente después de la hidrólisis se consideró como la fructosa unida a la molécula de K4 inicial.

45 El producto recuperado a partir del cultivo de *E. coli* DSM23644 transformado con pTrcHis-*kfoE* mostró la presencia de fructosa unida, confirmando que en esta cepa la pérdida de actividad de fructosil-transferasa era complementada por el plásmido.

Listado de secuencias

50 <110> GNOSIS S.p.A.

<120> Producción biotecnológica de condroitina

<130> G71589

55

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

60

<210> 1

<211> 1566

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

65

<220>

<221> gen

ES 2 644 443 T3

<222> (1)..(1566)

<400> 1

atgcttctaa	taatgtctgg	ttcctatggt	caacaagaat	taggggccga	atttggttct	60
attcctccaa	gctttcttcc	tttagcta	aatcagattat	ttaagcatca	agtatcttta	120
gggcatgatg	gtcatgcaat	atatctgggt	ttaccggaag	atthttgtgtt	tgacaaacat	180
gattatgaat	ggttgcttcg	taataaagta	acaatgatcc	ctgtc gatag	taacttgaca	240
ttagggcaag	cgatagttac	cgcatggaat	ttaataggag	ataaagatga	caaaggctta	300
caattattgt	ttggcgatac	actctttaa	aaaattcctg	caggggagga	attagtagca	360
aaaagtcatc	ctgatgaaaa	ttatcaatgg	gccatttttt	acgaaacaga	gttaagagcc	420
gtcagtagag	aagataataa	aatgtaatt	tgtgggtatt	tttcttttag	aaaaccgaat	480
ttttttatta	gggaattagt	tacttcaaaa	tttgatttta	cggcggcact	taaaaagtat	540
cacgacagct	atagtttagc	ctctatatac	gtgtctgatt	ggcttgattt	tggacatatt	600
aatacatact	ataagtcaaa	agtacaatac	acaaccacgc	gtgcatttaa	tgaattatgc	660
attacaacaa	aatccgttat	caaatcaagt	tcaaatgaaa	gtaaaattga	agctgaatca	720
aatgggtttg	aaactattcc	cggagaatta	aagatctata	ctccaatggt	attggaaccg	780
tttgatcata	tcagaaagag	ttataagctt	gaatatttat	ataatacgac	gttaaatgaa	840
ttatttgttt	tttctcgcct	accaaataat	atthtaacaa	atatattaat	aagttgttta	900
gacttcatcg	atctgtgcaa	agaatatcat	tcaattgata	ctgacaaaaa	tatactgcaa	960
gatttatttt	atgaaaaaac	gattgagcgg	gtagcaagt	acataacaga	tttaaatatt	1020
gatccaaatg	caaaatggaa	ttttaataat	aatataagcg	tttcaattaa	tgatattctt	1080
tatgatacta	ataaatttat	cccaagtgaa	ctgcaatata	aaactattat	gcatggcgat	1140
ttatgcttta	gtaataataat	ttttaacttt	agaactggta	gaatacaagt	ttttgatccc	1200
5	agaggattga	accactctgg	agaaataagt	atthtatggtg	atthttcgta	1260
	aaattatcac	attcaatact	agggtctctat	gattggataa	ttgcaggata	1320
	aataaaaaaa	ataaaaactca	tagtattgaa	ttcaaaaatta	atattgataa	1380
	gaaattcaat	caacatttgt	ttctataata	aaagagaaat	attcaatctc	1440
	ttgtatgcga	tgcaaataca	tttattttta	tcaatgcttc	cccttcattc	1500
	aaaaggcaag	atgcactatt	tgctaatagca	tttagattat	atgaaatttt	1560
	gcagta					1566

<210> 2

<211> 522

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> proteína

15 <222> (1)..(522)

ES 2 644 443 T3

<400> 2

Met Leu Leu Ile Met Ser Gly Ser Tyr Val Gln Gln Glu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Glu Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Phe Leu Pro Leu Ala Asn Lys Arg
 20 25 30

Leu Phe Lys His Gln Val Ser Leu Gly His Asp Gly His Ala Ile Tyr
 35 40 45

Leu Val Leu Pro Glu Asp Phe Val Phe Asp Lys His Asp Tyr Glu Trp
 50 55 60

Leu Leu Arg Asn Lys Val Thr Met Ile Pro Val Asp Ser Asn Leu Thr
 65 70 75 80

Leu Gly Gln Ala Ile Val Thr Ala Trp Asn Leu Ile Gly Asp Lys Asp
 85 90 95

Asp Lys Gly Leu Gln Leu Leu Phe Gly Asp Thr Leu Phe Lys Lys Ile
 100 105 110

Pro Ala Gly Glu Glu Leu Val Ala Lys Ser His Pro Asp Glu Asn Tyr
 115 120 125

Gln Trp Ala Ile Phe Tyr Glu Thr Glu Leu Arg Ala Val Ser Arg Glu
 130 135 140

Asp Asn Lys Asn Val Ile Cys Gly Tyr Phe Ser Phe Arg Lys Pro Asn
 145 150 155 160

ES 2 644 443 T3

Phe Phe Ile Arg Glu Leu Val Thr Ser Lys Phe Asp Phe Thr Ala Ala
 165 170 175
 Leu Lys Lys Tyr His Asp Ser Tyr Ser Leu Ala Ser Ile Tyr Val Ser
 180 185 190
 Asp Trp Leu Asp Phe Gly His Ile Asn Thr Tyr Tyr Lys Ser Lys Val
 195 200 205
 Gln Tyr Thr Thr Gln Arg Ala Phe Asn Glu Leu Cys Ile Thr Thr Lys
 210 215 220
 Ser Val Ile Lys Ser Ser Ser Asn Glu Ser Lys Ile Glu Ala Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Trp Phe Glu Thr Ile Pro Gly Glu Leu Lys Ile Tyr Thr Pro Met
 245 250 255
 Leu Leu Glu Pro Phe Asp His Ile Arg Lys Ser Tyr Lys Leu Glu Tyr
 260 265 270
 Leu Tyr Asn Thr Thr Leu Asn Glu Leu Phe Val Phe Ser Arg Leu Pro
 275 280 285
 Asn Asn Ile Leu Thr Asn Ile Leu Ile Ser Cys Leu Asp Phe Ile Asp
 290 295 300
 Leu Cys Lys Glu Tyr His Ser Ile Asp Thr Asp Lys Asn Ile Leu Gln
 305 310 315 320
 Asp Leu Phe Tyr Glu Lys Thr Ile Glu Arg Val Ser Lys Tyr Ile Thr
 325 330 335
 Asp Leu Asn Ile Asp Pro Asn Ala Lys Trp Asn Phe Asn Asn Asn Ile
 340 345 350
 Ser Val Ser Ile Asn Asp Ile Leu Tyr Asp Thr Asn Lys Phe Ile Pro
 355 360 365
 Ser Glu Leu Gln Tyr Lys Thr Ile Met His Gly Asp Leu Cys Phe Ser
 370 375 380
 Asn Ile Ile Phe Asn Phe Arg Thr Gly Arg Ile Gln Val Phe Asp Pro
 385 390 395 400
 Arg Gly Leu Asn His Ser Gly Glu Ile Ser Ile Tyr Gly Asp Phe Arg
 405 410 415
 Tyr Asp Ile Ala Lys Leu Ser His Ser Ile Leu Gly Leu Tyr Asp Trp

<220>
 <223> OL149

5 <220>
 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(22)

10 <400> 5
 ccactcataa atcctcatag ag 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> OL150

20 <220>
 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(22)

25 <400> 6
 ccaacttact tctgacaacg at 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> OL153

35 <220>
 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(22)

40 <400> 7
 aatccgacgg ggactgtaga tt 22

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> OL142

50 <220>
 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(20)

55 <400> 8
 aactgttcgc caggctcaag 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> OL143

65 <220>
 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(20)

ES 2 644 443 T3

	<400> 9		
	gcgttttccc ttgtccagat	20	
5	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> secuencia artificial		
10	<220> <223> OL154		
	<220> <221> oligonucleótido <222> (1)..(23)		
15	<400> 10		
	gctaattgat atgattgcca ggt	23	
20	<210> 11 <211> 27 <212> ADN <213> secuencia artificial		
25	<220> <223> OL169		
	<220> <221> oligonucleótido <222> (1)..(27)		
30	<400> 11		
	tgaggatgatt gttggtaaac cttgggtg	27	
35	<210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial		
40	<220> <223> OL166		
	<220> <221> oligonucleótido <222> (1)..(25)		
45	<400> 12		
	tactgtttct gcttgcccc gagtt	25	
50	<210> 13 <211> 167 <212> ADN <213> Escherichia coli		
55	<220> <221> gen <222> (1)..(167) <223> reorganizado		
60	<400> 13		
	atgctttctaa taatgtctgg ttcctatggt caacaagaat gtgtaggctg gagctgcttc	60	
	gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcgaata ggaactaagg aggatattca	120	
	tatgtgcatt tagattatat gaaattttta aggaggctgc agtatga	167	

ES 2 644 443 T3

<210> 14
 <211> 1559
 <212> ADN
 5 <213> Escherichia coli

 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1559)
 10 <223> reorganizado

 <400> 14

 atgcttctaa taatgtctgg ttcctatggt caacaagaat gtgtaggctg gagctgcttc 60
 gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcgggaata ggaacttcaa gatccccac 120
 gctgccgcaa gcactcaggg cgcaagggct gctaaaggaa gcggaacacg tagaaagcca 180
 gtccgcagaa acgggtgctga ccccggatga atgtcagcta ctgggctatc tggacaaggg 240
 aaaacgcaag cgcaaagaga aagcaggtag cttgcagtgg gcttacetgg cgatagctag 300
 actgggcggt tttatggaca gcaagcgaac cggaattgcc agctggggcg ccctctggta 360
 aggttgggaa gccctgcaaa gtaaactgga tggctttctt gccgccaagg atctgatggc 420
 gcaggggatc aagatctgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag 480
 atggattgca cgcaggttct ccggccgctt gggtaggagag gctattcggc tatgactggg 540
 cacaacagac aatcggctgc tctaattgcc ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc 600
 cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag 660
 cgcggctatc gtggctggcc acgacggggc ttccttgccg agctgtgctc gacgttgta 720
 ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctctgcat 780
 ctcaccttgc tctgcccag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata 840
 cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac 900
 gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc 960
 tcgcccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgcggc gaggatctcg 1020
 tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg 1080
 gattcatoga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggtta 1140
 cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg 1200
 gtatcgccgc tcccgatcgc cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac gaggcttct 1260
 gagcgggact ctgggggttcg aatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga 1320
 tttcgattcc accgccgct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc 1380
 cggctggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgcc accccagctt 1440
 caaaagcgt ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcgaa taggaactaa 1500
 15 ggaggatatt catatgtgca tttagattat atgaaatctt taaggaggct gcagtatga 1559

<210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> OL172
 <220>
 10 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(36)
 <400> 15
 acaacatggt actaataatg tctgggtcct atgttc 36
 15
 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> OL173
 <220>
 25 <221> oligonucleótido
 <222> (1)..(31)
 <400> 16
 actggatcct tatcactg cagcctcct a 31

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo recombinante que produce condroitina, definido como un glucosaminoglicano lineal constituido por residuos alternos de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) unidos mediante enlaces β 1-3 (GlcUA \rightarrow GalNAc) y β 1-4 (GalNAc \rightarrow GlcUA), caracterizado por que dicho microorganismo se deriva a partir de un microorganismo que pertenece al grupo del antígeno K y en dicho microorganismo el gen *kfoE* presente originalmente que codifica un enzima responsable de la adición de residuos de fructosa al esqueleto de condroitina lineal es inactivado por la supresión o sustitución completamente o en parte de dicho gen o la disrupción por inserción de una secuencia de nucleótidos adicional y en el que dicho gen *kfoE* codifica una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2;
- (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 modificada por supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de fructosil-transferasa; y
- (C) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta homología de por lo menos 50% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 y que presenta una actividad de fructosil-transferasa.
2. Microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en el que el gen *kfoE* inactivado es un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1;
- (b) un ADN que hibrida con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC ID nº 1 y codifica una proteína que presenta una actividad de fructosil-transferasa; y
- (c) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una homología de por lo menos 50% con el nucleótido de SEC ID nº 1 y que codifica una proteína que presenta una actividad de fructosil-transferasa.
3. Microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el gen *kfoE* es inactivado por la sustitución completa o parcial del mismo con un casete de resistencia de la canamicina y su extracción posterior, que da como resultado la supresión completa o parcial del gen *kfoE*.
4. Microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se deriva a partir de una bacteria que pertenece a un género seleccionado de entre *Escherichia*, *Haemophilus*, *Campylobacter*, *Gloeocapsa* y *Vibrio*.
5. Microorganismo recombinante según la reivindicación 4, que se deriva a partir de una bacteria que pertenece a la especie *Escherichia coli*.
6. Microorganismo recombinante según la reivindicación 5, que se deriva a partir de un serotipo de la especie *Escherichia coli* que pertenece al grupo 2 del antígeno K.
7. Microorganismo recombinante según la reivindicación 6, que se deriva a partir de la cepa *Escherichia coli* O5:K4:H4U1-41.
8. Microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es *Escherichia coli* DSM23578 o *Escherichia coli* DSM23644.
9. Microorganismo recombinante según la reivindicación 8, que es *Escherichia coli* DSM23644.
10. Procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina, en el que se utiliza un microorganismo recombinante seleccionado de entre *Escherichia coli* DSM23578 y *Escherichia coli* DSM23644.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el microorganismo recombinante es *Escherichia coli* DSM23644.
12. Procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina, que comprende las etapas siguientes:
- a. cultivar en un medio adecuado el microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9
- b. recuperar y purificar la condroitina presente en el cultivo microbiano.

13. Procedimiento para la producción biotecnológica de condroitina según la reivindicación 12, en el que el microorganismo recombinante es *Escherichia coli* DSM23578 o *Escherichia coli* DSM23644.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el microorganismo recombinante es *Escherichia coli* DSM23644.

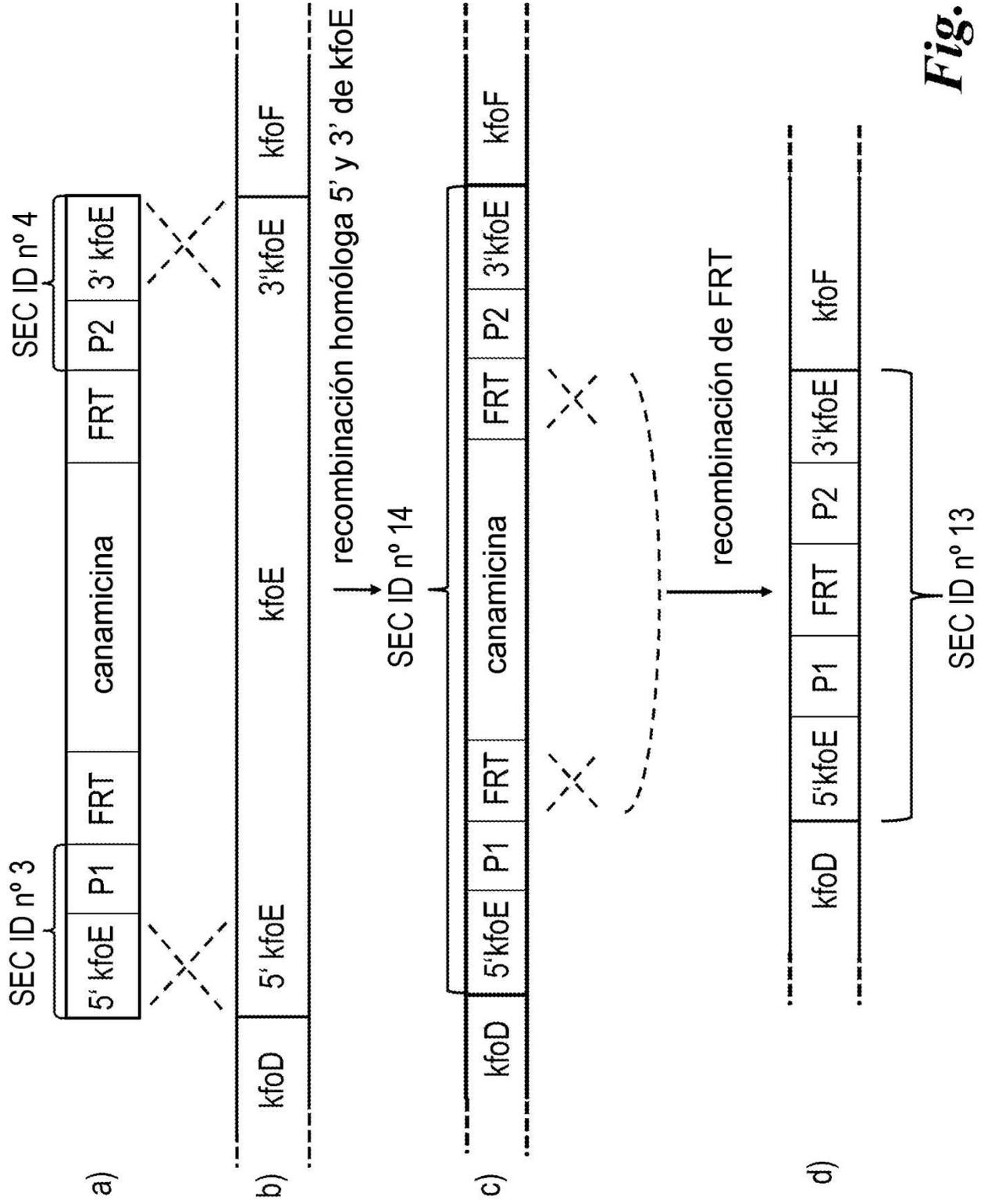


Fig. 1

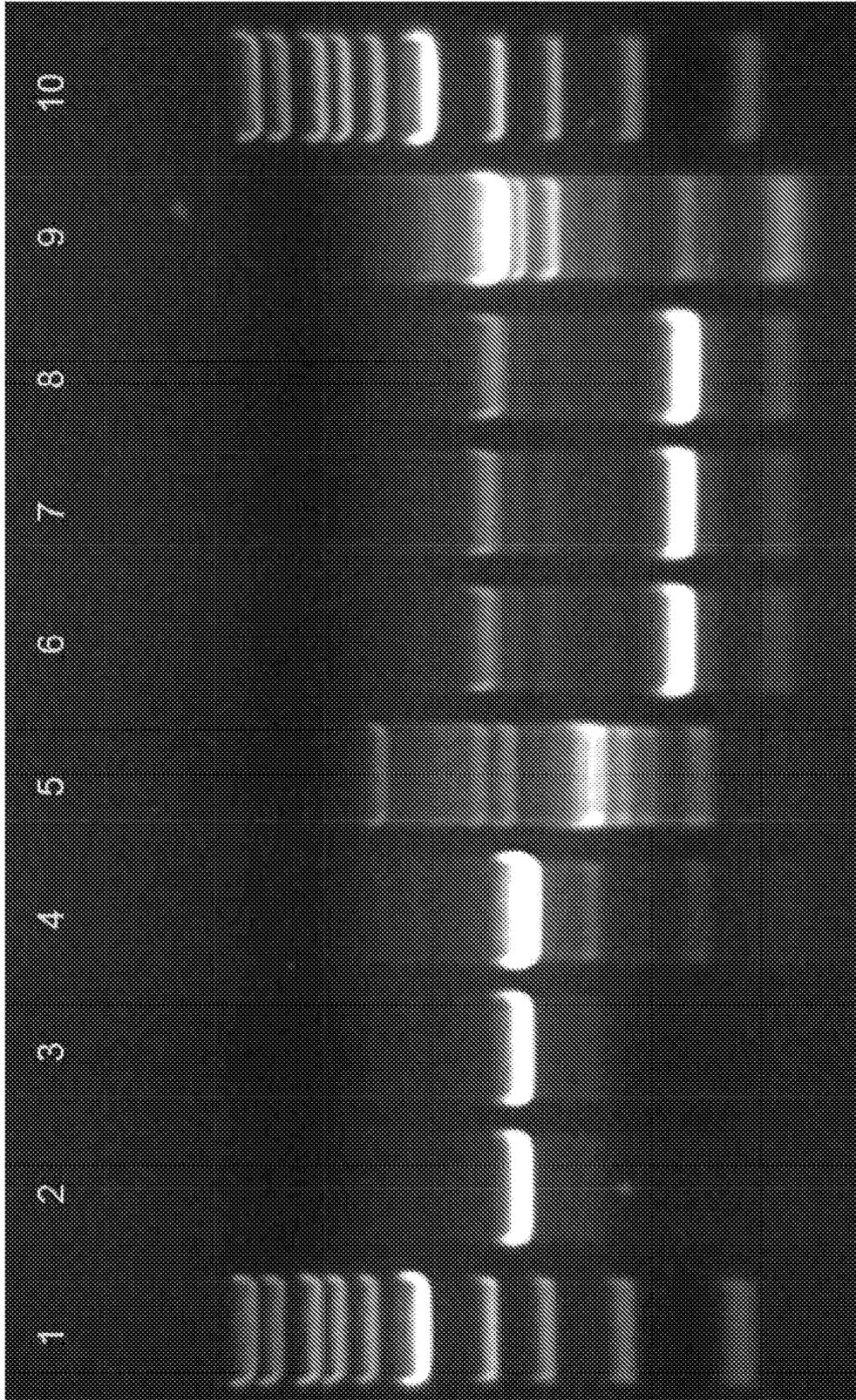


Fig. 2

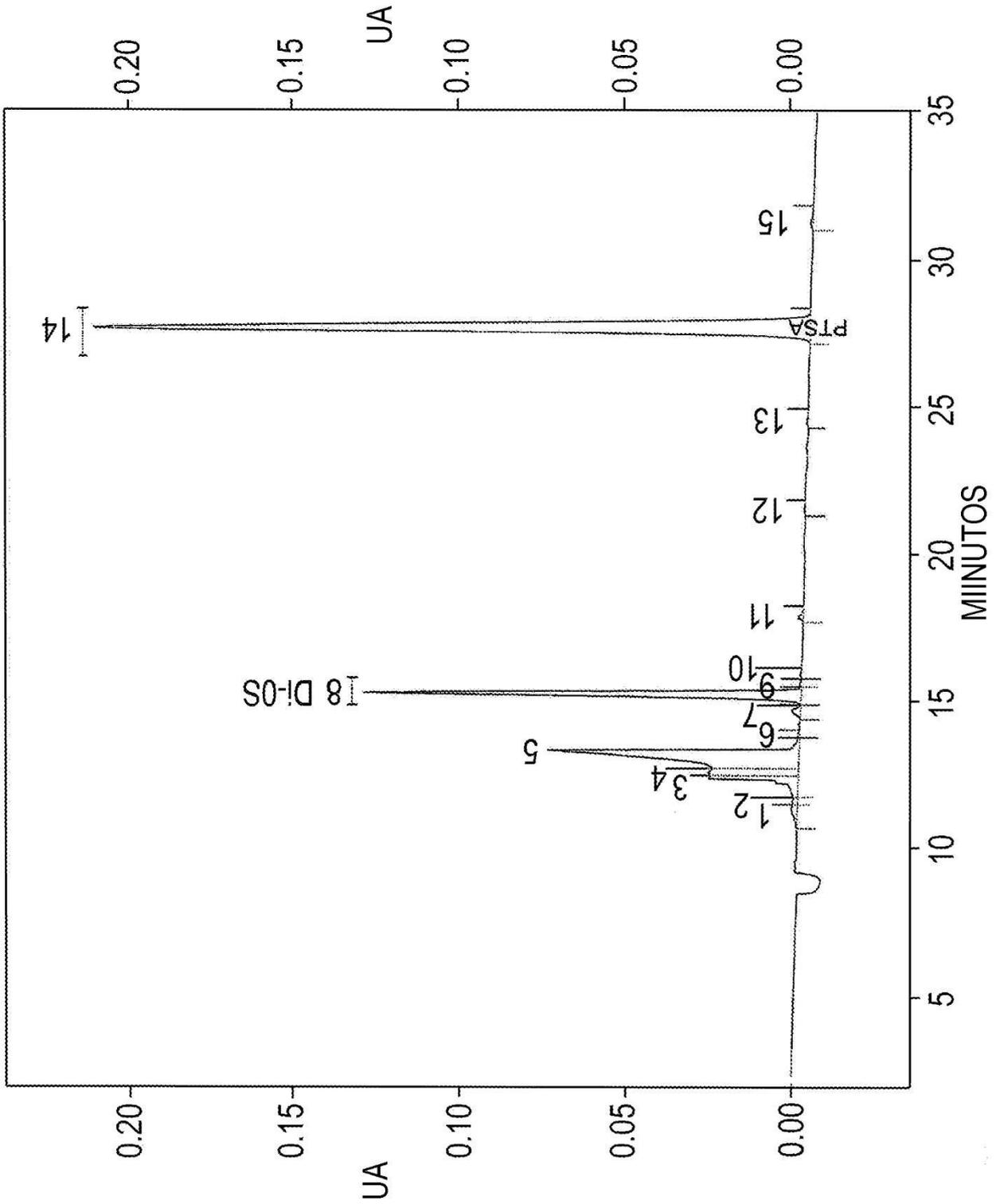


Fig. 3

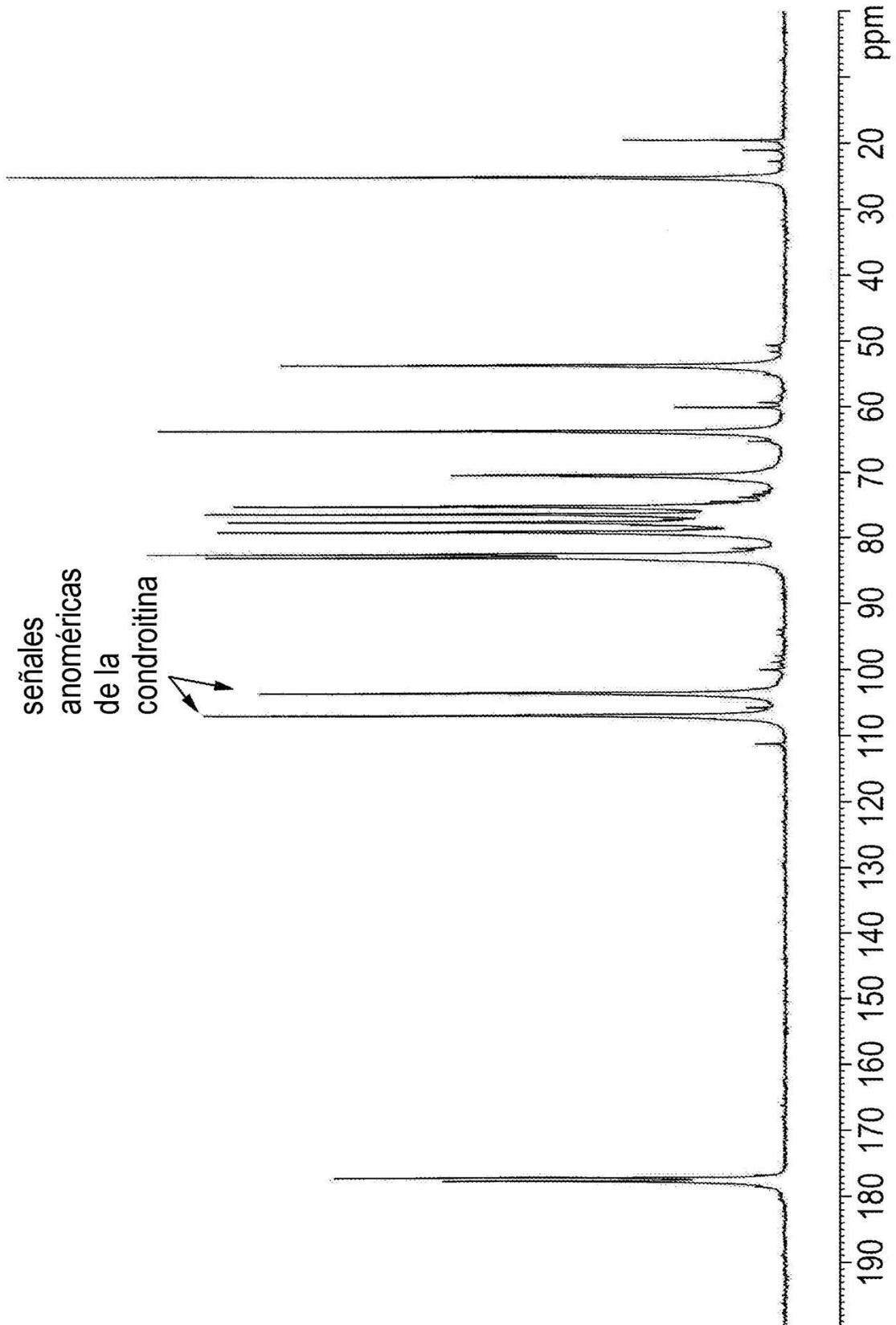


Fig. 4