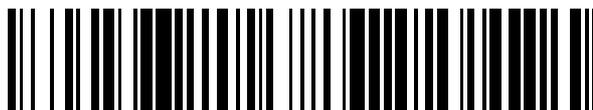


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 035**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12N 15/31** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12P 13/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014 PCT/KR2014/004150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14182119**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014 E 14794775 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2994478**

54 Título: **Nuevas variantes de la proteína RhtB y método de producción de O-fosfoserina utilizando las mismas**

30 Prioridad:

**10.05.2013 KR 20130053428**

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

**29.05.2018**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
330 Dongho-ro Jung-gu  
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SOL;  
KIM, HYE WON;  
CHANG, JIN SOOK y  
YOO, IN HWA**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 670 035 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

Nuevas variantes de la proteína RhtB y método de producción de O-fosfofoserina utilizando las mismas

5 **Antecedentes****Campo**

10 La presente divulgación se refiere a una variante de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) que tiene una mayor capacidad para exportar O-fosfofoserina (OPS), que es un precursor de L-cisteína, un polinucleótido que codifica la proteína, un vector que comprende el polinucleótido, un microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína, un método de producción de O-fosfofoserina utilizando el microorganismo, y un método de preparación de cisteína o sus derivados, que comprende hacer reaccionar O-fosfofoserina, producida por el método que produce OPS, con un sulfuro en presencia de O-fosfofoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

**Descripción de la técnica anterior**

20 L-cisteína, un aminoácido que desempeña un papel importante en el metabolismo del azufre en todos los organismos vivos, se utiliza no solo en la síntesis de proteínas biológicas, tales como queratina del cabello, glutatión, biotina, metionina, y otros metabolitos que contienen azufre, sino también como un precursor para la biosíntesis de la coenzima A.

25 Los métodos conocidos de producción de L-cisteína utilizando microorganismos incluyen un método de conversión biológica de D,L-ATC a L-cisteína utilizando microorganismos (Ryu OH *et al.*, *Process Biochem.*, 32:201-209, 1997). Otro método conocido es un método de producción de L-cisteína por fermentación directa utilizando *E. coli* (documento EP 0885962B; Wada M y Takagi H, *Appl. Microbiol. Biochem.*, 73:48-54, 2006). Mientras tanto, los presentes inventores hallaron una enzima (O-fosfofoserina sulfhidrilasa (OPSS)) que sintetiza L-cisteína a partir de O-fosfofoserina (OPS) en ciertos microorganismos. Basándose en este hallazgo, los presentes inventores desarrollaron un método de producción de cisteína por reacción de OPS con la enzima OPSS mediante el cultivo de un microorganismo mutado para acumular OPS en el mismo (patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2012-004111). Siguen existiendo las necesidades para producir OPS en cantidades excesivas, a fin de producir cisteína a un alto rendimiento. En consecuencia, los presentes inventores han llevado a cabo considerables esfuerzos para descubrir un exportador apropiado que permite que la O-fosfofoserina producida en una cepa que produce OPS sea liberada de las células sin dificultades. Además, basándose en varios tipos de transportadores conocidos, los presentes inventores identificaron sistemáticamente ydeD que codifica la proteína de eflujo de O-acetilserina/cisteína, yfiK que codifica la permeasa de exportación de O-acetilserina/cisteína (Franke I, Resch A, Dassler T, Maier T y Bock A, *J. Bacteriology*, 185: 1161-166, 2003), rhtB que codifica la proteína de eflujo de homoserina/homoserina lactona (Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA *FEBS Lett* 1999; 452(3):228-32) y similares, y se descubrió particularmente que la mejora de RhtB en la cepa de producción de OPS da lugar a un aumento de la concentración de OPS (patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2012-0041115).

45 El documento KR-2012-0041115 describe un método de preparación de L-cisteína o derivado de la misma a partir de O-fosfofoserina preparada a partir de una cepa. Se describe un método de preparación de cisteína o derivado de la misma, comprendiendo el método: una etapa de cultivo de un microorganismo recombinante mutado para atenuar la actividad intrínseca de SerB (fosfofoserina fosfatasa) para producir O-fosfofoserina (OPS); y una etapa de reacción de OPS con sulfuros en presencia de un microorganismos que expresa OPSS (O-fosfofoserina sulfhidrilasa).

50 El documento EP 2 444 481 A1 describe un método de producción de cisteína o sus derivados utilizando O-fosfofoserina como un microorganismo intermedio y recombinante para su uso en la producción de O-fosfofoserina.

Sin embargo, para la producción de un mayor rendimiento de cisteína, todavía se requiere el desarrollo de un transportador que tenga una mayor capacidad para exportar un precursor de OPS de la cepa que produce OPS.

55

**Sumario**

60 Los presentes inventores han realizado amplios esfuerzos para descubrir variantes de la proteína RhtB que tienen una mayor actividad de exportación de OPS de manera que sea capaz de aumentar aún más la producción de OPS, y como resultado, han identificado cuatro nuevas variantes de proteína RhtB que tienen una mayor actividad de exportación de OPS, y han descubierto que las proteínas pueden exportar OPS de una cepa que produce OPS de manera más eficaz, completando de este modo la presente divulgación.

65 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar una variante de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) que tiene una actividad de exportación mejorada de O-fosfofoserina (OPS).

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un polinucleótido que codifica la variante de proteína y un vector que comprende el polinucleótido.

5 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo que produce OPS, que comprende la variante de proteína.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un método de producción de OPS, que comprende cultivar el microorganismo.

10 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un método de producción de cisteína o sus derivados, que comprende hacer reaccionar O-fosfoserina, producida por el método anteriormente descrito para producir O-fosfoserina, con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra un método de producción de L-cisteína mediante la acumulación de O-fosfoserina a partir de la biosíntesis y la fermentación microbiana de O-fosfoserina y la conversión enzimática de la O-fosfoserina acumulada en L-cisteína.

20 **Descripción detallada**

El aspecto de la presente divulgación incluye una variante de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) que tiene una actividad de exportación mejorada de O-fosfoserina (OPS).

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término "O-fosfoserina (descrito en lo sucesivo como "OPS")" se refiere a un éster de serina y ácido fosfórico, que es un componente de numerosas proteínas. La OPS es un precursor de L-cisteína y se puede convertir en cisteína por reacción con un sulfuro bajo la acción catalítica de OPS sulfhidrilasa (descrita en lo sucesivo como "OPSS"). En consecuencia, es un factor importante para aumentar la productividad de OPS en la producción de cisteína, y de este modo se requiere para desarrollar los transportadores que permiten que la OPS intracelular sea eficazmente secretada a partir de cepas que producen OPS.

30 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína RhtB" (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) se conoce como un exportador de homoserina/homoserina lactona que es un precursor de la treonina. La información sobre la proteína RhtB está disponible a partir de bases de datos conocidas, tales como GenBank de CNIB. Por ejemplo, puede ser una proteína depositada con el número de acceso AAT48223 (EG11469), y la secuencia de aminoácidos de la misma puede exponerse en la SEQ ID NO: 1.

35 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "variante de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) que tiene una actividad exportadora mejorada de O-fosfoserina" se refiere a una proteína que ha mejorado la actividad de exportación de OPS en comparación con la proteína RhtB de tipo silvestre y que comprende una mutación en uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína RhtB de tipo silvestre. Específicamente, se identifican cuatro variantes de proteína RhtB que tienen una actividad de exportación mejorada de OPS mediante la inducción de mutaciones aleatorias en un polinucleótido que codifica la proteína RhtB. Entre las variantes de proteínas identificadas, se etiquetó una variante de proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 como "RhtB m1"; se etiquetó una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 como "RhtB m2"; se etiquetó una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 como "RhtB m3"; y se etiquetó una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 como "RhtB m4".

40 Las variantes de proteína RhtB de la presente divulgación incluyen no solo las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 2, 3, 4 o 5, sino también las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que muestra una homología de al menos 70 %, específicamente al menos 80 %, más específicamente al menos 90 %, incluso más específicamente al menos 95 %, incluso aún más específicamente al menos 98 %, y lo más específicamente al menos 99 % con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4 o 5, y han mejorado esencialmente la actividad de exportación de O-fosfoserina en comparación con una proteína RhtB de tipo silvestre. Además, es evidente que las proteínas que comprenden una delección, modificación, sustitución o adición de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína RhtB también están incluidas en el alcance de la presente divulgación, siempre que comprendan una secuencia de aminoácidos que tenga la homología descrita anteriormente y que tenga actividad biológica esencialmente idéntica o comparable a la proteína RhtB.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótidos o polipéptidos. La correspondencia entre las secuencias de una forma a otra se puede determinar mediante técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la homología se puede determinar por una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas de polipéptido o moléculas de polinucleótido mediante la alineación de la información de secuencia y utilizando programas informáticos de fácil acceso. Alternativamente, la

homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman híbridos estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa específica de cadena sencilla, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la relación entre proteínas que poseen un "origen común evolutivo", incluyendo proteínas de superfamilias y proteínas homólogas de diferentes especies. Tales proteínas (y sus genes codificantes) tienen una homología de secuencia, como se refleja por su alto grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso común y en la presente divulgación, el término "homólogo", cuando se modifica con un adjetivo como "muy alto", puede referirse a una similitud de secuencia y no a un origen común evolutivo.

15 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "similitud de secuencia" se refiere al grado de identidad o correspondencia entre el ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen común evolutivo. En una realización, dos secuencias de aminoácidos son "esencialmente homólogas" o "esencialmente similares" cuando al menos aproximadamente 21 % (específicamente al menos aproximadamente 50 %, y más específicamente al menos aproximadamente 75 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 99 %) de la concordancia polipeptídica sobre la longitud definida de las secuencias de aminoácidos. Las secuencias que son esencialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias utilizando un software estándar disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas como se definen para ese sistema particular. Definir la condiciones de hibridación apropiadas se encuentra en la capacidad de la materia (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, *infra*).

25 Debido a que las variantes de proteína RhtB de la presente divulgación tienen una actividad de exportación mejorada de OPS en comparación con una proteína RhtB de tipo silvestre, la productividad de OPS de un microorganismo que produce OPS se puede aumentar mediante la expresión de las variantes de proteína RhtB de la presente divulgación en el microorganismo.

30 En un ejemplo de la presente divulgación, con el fin de identificar variantes de proteína RhtB que tienen actividad de exportación mejorada de OPS, el gen que codifica la proteína RhtB de tipo silvestre se mutó al azar, y el gen mutado se introdujo en microorganismos de *E. coli* recombinante que tienen una actividad reducida de fosfoserina fosfatasa endógena (descrita en lo sucesivo como "ŞerB"), y las colonias que muestran la eliminación de la inhibición del crecimiento en las condiciones del medio que contiene una cantidad excesiva de OPS, identificando de este modo 4 tipos de variantes de proteína RhtB como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Asimismo, una cepa que produce OPS, que expresa la variante de proteína RhtB de la presente divulgación y tiene una actividad reducida de ŞerB endógena, mostró un aumento en la productividad de OPS de hasta el 10 % en comparación con una cepa que produce OPS que expresa la proteína RhtB de tipo silvestre, y una cepa que expresa la variante de proteína RhtB y tiene actividades mejoradas de SerA y SerC mostró un aumento en la productividad de OPS de hasta el 14 % (Ejemplo 2). Dichos resultados sugieren que la variante de proteína RhtB de la presente divulgación en una cepa que produce OPS puede aumentar significativamente la productividad de la cepa de OPS.

40 Un aspecto adicional de la presente divulgación también incluye un polinucleótido que codifica la variante de proteína RhtB y un vector que comprende el polinucleótido.

45 Como se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de unidades de nucleótidos unidas entre sí por un enlace covalente para formar una cadena. El término significa generalmente una cadena de ADN o ARN que tiene cualquier longitud. En la presente divulgación, el término significa un fragmento de polinucleótido que codifica la variante de proteína RhtB.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación de y/o la transferencia de un ácido nucleico en una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que otro segmento de ADN puede estar unido de manera que se produzca la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, capaz de replicación bajo su propio control. El término "vector" puede incluir tanto vehículos virales como no virales para introducir el ácido nucleico en una célula huésped *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. También puede incluir ADNs minicirculo. Por ejemplo, el vector puede ser un plásmido sin secuencias de ADN bacteriano. Se ha demostrado que la eliminación de secuencias de ADN bacteriano que son ricas en regiones CpG disminuye el silenciamiento de la expresión del transgén y resulta en una expresión más persistente de vectores de ADN plasmídico (p. ej., Ehrhardt, A. *et al.* (2003) *HumGene Ther* 10: 215-25; Yet, N. S. (2002) *Mol Ther* 5: 731-38; Chen, Z. Y. *et al.* (2004) *Gene Ther* 11: 856-64). El término "vector" también puede incluir transposones (*Annu Rev Genet.* 2003; 37:3-29), o cromosomas artificiales. Específicamente, se pueden utilizar los vectores tales como pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322 y pMW118 y, en un ejemplo de la presente divulgación, se utilizó un vector pCL1920.

65 Un aspecto adicional de la presente divulgación también incluye un microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB.

En la presente memoria, la proteína RhtB, la variante de proteína RhtB y la OPS son como se ha descrito anteriormente.

5 El microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB de un ejemplo de la presente divulgación puede secretar eficazmente OPS en comparación con un microorganismo que comprende la proteína RhtB de tipo silvestre, y de este modo puede ser más útil para la producción de OPS que es un precursor de la cisteína.

10 El microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS puede ser un microorganismo que comprende la variante de proteína RhtB, que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS debido a una mutación en el gen cromosómico que codifica la proteína RhtB, y/o un microorganismo que comprende la variante de proteína RhtB que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS y se obtiene mediante la introducción de un vector que comprende un polinucleótido que codifica la variante de proteína RhtB, pero el alcance de la presente divulgación no se limita a ello. En un ejemplo de la presente divulgación, un microorganismo que produce OPS que comprende una variante de proteína RhtB representativa que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS puede construirse mediante la introducción en un vector de *E. coli* que comprende un polinucleótido que codifica la variante de proteína RhtB que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS.

20 Además, el microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB puede tener una actividad mejorada de la variante de proteína RhtB.

25 Los métodos de mejora de la actividad de proteína RhtB incluyen, entre otros, un método de aumento del número de copias intracelulares de un gen que codifica la variante de proteína, un método de introducción de una mutación en una secuencia reguladora de la expresión para el gen cromosómico que codifica la variante de proteína, un método de reemplazo de la secuencia reguladora de la expresión para el gen cromosómico que codifica la variante de proteína con una secuencia que tiene una fuerte actividad, un método de sustitución del gen cromosómico que codifica la proteína con un gen mutado para aumentar la actividad de la variante de proteína, y un método de introducción de una mutación en el gen cromosómico que codifica la proteína para potenciar la actividad de la proteína. El método de potenciación de la actividad de la proteína se puede aplicar del mismo modo para potenciar las actividades de otras proteínas.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término "introducción" se refiere a un método de transferencia de un vector, que comprende un polinucleótido que codifica la variante de proteína RhtB, con una célula huésped. Esta introducción se puede realizar con facilidad utilizando cualquier método convencional conocido en la materia. En general, los ejemplos del método de introducción pueden incluir precipitación con CaCl<sub>2</sub>, el método Hanahan que es un método de CaCl<sub>2</sub> mejorado que utiliza DMSO (dimetilsulfóxido) como un material reductor para aumentar la eficiencia, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, fusión de protoplastos, agitación utilizando fibra de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por PEG, transformación mediada por dextrano sulfato, transformación mediada por lipofectamina, y transformación mediada por desecación/inhibición. El método de transformación del vector no se limita a los ejemplos descritos anteriormente, y cualquiera de los métodos de transformación o transfección convencionales conocidos en la materia se puede utilizar sin limitación.

45 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "microorganismo que produce OPS" se refiere a una cepa microbiana procariota o eucariota capaz de producir OPS en el mismo. Por ejemplo, el microorganismo que produce OPS puede ser un microorganismo capaz de acumular OPS en el mismo por modificación por ingeniería genética, pero no se limita a ello. Para el fin de la presente divulgación, el microorganismo puede ser cualquier microorganismo procariota o eucariota que comprende la variante de proteína RhtB, y de este modo puede producir OPS. Ejemplos del microorganismo incluyen cepas microbianas pertenecientes al género *Escherichia*, al género *Erwinia*, al género *Serratia*, al género *Providencia*, al género *Corynebacterium* y al género *Brevibacterium*. Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo del género *Escherichia*. Más específicamente, puede ser *E. coli*. En particular, un microorganismo de *Escherichia* o del género *Corynebacterium* puede producir OPS y L-serina, ya que contiene proteínas SerA, SerC y SerB que son enzimas en la vía de la biosíntesis de L-serina (Ahmed Zahoor, *Computational and structural biotechnology journal*, vol. 3, octubre de 2012; Wendisch VF *et al.*, *Curr Opin Microbiol.* Junio de 2006; 9 (3):268-74; Peters-Wendisch P *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* Nov. de 2005; 71(11):7139-44).

60 El microorganismo que produce OPS puede ser específicamente un microorganismo mutado para reducir la actividad de la fosfatasa fosfoserina endógena (SerB). La SerB tiene una actividad de conversión de OPS a L-serina, y de este modo el microorganismo mutado para reducir la actividad de SerB puede tener la propiedad de acumulación de OPS en el mismo, lo que sugiere que es útil para la producción de OPS. La reducción en la actividad de SerB significa que la actividad de SerB se reduce o se elimina en comparación con la de una cepa no mutada. La reducción en la actividad de SerB se puede lograr utilizando diversos métodos bien conocidos en la materia. Los ejemplos del método de reducción de la actividad de la enzima SerB incluyen, entre otros, un método de sustitución del gen cromosómico que codifica la enzima con un gen mutado para reducir o eliminar la actividad de

la enzima, un método de introducción de una mutación en una secuencia reguladora de la expresión para el gen cromosómico que codifica la enzima, un método de reemplazo de una secuencia reguladora de la expresión para el gen cromosómico que codifica la enzima con un gen que tiene actividad débil, delección del gen cromosómico que codifica la enzima, un método de introducción de un oligonucleótido antisentido que se une de manera complementaria al transcrito del gen cromosómico para inhibir la traducción del ARNm en la proteína, un método de adición artificial de una secuencia complementaria a la secuencia SD del gen que codifica la enzima ante la secuencia SD para formar una estructura secundaria que hace imposible la adhesión del ribosoma, y un método de modificación por ingeniería de transcripción inversa (ITI) de adición de un promotor al extremo 3' del marco de lectura abierto (MLA) de la secuencia correspondiente para que sea un transcrito inverso. En un ejemplo de la presente divulgación, utilizando CA07-0012 (número de acceso: KCCM11121P) desvelado en la publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2012-004115 y en la publicación de patente estadounidense abierta a inspección pública n.º 2012-0190081 como un microorganismo mutado para reducir la actividad de SerB endógena, se introdujo en el microorganismo un vector que comprende un polinucleótido que codifica la variante de proteína RhtB de la presente divulgación.

Además, el microorganismo que produce OPS puede ser un microorganismo que tiene una actividad mejorada de deshidrogenasa fosfoglicerato (SerA) o fosfoserina aminotransferasa (SerC).

La SerA es una proteína que tiene una actividad de conversión de 3-fosfoglicerato a 3-fosfohidroxipiruvato, y la SerA puede ser una proteína de tipo silvestre o un mutante resistente a la inhibición por retroalimentación de la serina. También, la SerC es una proteína que tiene una actividad de conversión de 3-fosfoglicerato a O-fosfoserina. De este modo, el microorganismo con actividad mejorada de SerA y/o SerC puede ser útil como una cepa que produce OPS. En un ejemplo de la presente divulgación, utilizando CA07-0022/PCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC (número de acceso: KCCM11103P), que es un microorganismo que tiene una actividad mejorada de SerA (resistente a la inhibición por retroalimentación de la serina) y SerC como se desvela en la publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2012-004115, como un microorganismo que produce OPS, la variante de proteína RhtB de la presente divulgación se introduce en el microorganismo para producir OPS. Asimismo, en la presente divulgación, la cepa que produce OPS CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-rhtB m1 que comprende la variante de proteína RhtB m1 de la presente divulgación, que es una cepa representativa que tiene introducida la variante de la proteína rhtB que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS, fue denominada "Escherichia coli CA07-0227" y depositada en el Centro Cultural de Microorganismos de Corea, reconocido como autoridad de depósito internacional en virtud del Tratado de Budapest, el 7 de marzo de 2013 con el número de acceso KCCM11398P (Ejemplo 2).

Además, el microorganismo puede tener además una capacidad reducida para realizar la captación intracelular o la degradación de OPS.

Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo mutado para reducir la actividad del transportador ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE (operón PhnCDE, es decir, el componente de transporte de fosfonato de unión a ATP (PhnC; EG 10713)-componente proteico del transportador de Pn de unión periplásmica (PhnD; EG 10714)-componente de la membrana integral del transportador ABC de alquilfosfonato (PhnE; EG 11283)), fosfatasa alcalina (PhoA) o fosfatasa ácida (AphA).

El microorganismo que produce OPS de la presente divulgación puede tener además una actividad mejorada de pirimidin nucleótido transhidrogenasa (PntAB; EC 1.6.1.1). Como se ha descrito previamente en Sauer U P *et al.*, *J Biol Chem.* 20; 279 (8): 6613-9. Epub 2003, PntAB participa en el metabolismo de NADPH para regular el equilibrio redox intracelular.

Un aspecto adicional de la presente divulgación también incluye un método de producción de OPS, que comprende el cultivo del microorganismo que produce OPS.

En la presente memoria, la OPS y el microorganismo que produce OPS son como se ha descrito anteriormente.

Específicamente, el método de producción de OPS puede comprender las etapas que consisten en: a) cultivar un microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB para producir OPS; y b) aislar OPS del cultivo del microorganismo. Específicamente, el método puede comprender las etapas que consisten en: a) cultivar un microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB para producir OPS; y b) aislar OPS del cultivo del microorganismo, pero no se limita a los mismos.

El microorganismo que produce OPS es específicamente un microorganismo que tiene una actividad reducida de SerB endógeno de manera que es capaz de acumular OPS en el mismo. Además, el microorganismo que produce OPS puede tener además una actividad mejorada de SerA resistente a la inhibición por retroalimentación de la serina y/o SerC, y esta actividad es como se ha descrito anteriormente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "cultivo" significa cultivar el microorganismo en condiciones controladas artificialmente. Un proceso de cultivo en la presente divulgación puede realizarse utilizando un medio y condiciones de cultivo adecuados bien conocidos en la materia. Cualquier experto en la materia puede controlar

fácilmente el proceso de cultivo, dependiendo del tipo de cepa seleccionada. Específicamente, el cultivo puede ser un cultivo de tipo por lotes, un cultivo continuo o un cultivo discontinuo, pero no se limita a ellos.

En el cultivo del microorganismo recombinante que tiene una actividad reducida de  $\text{SerB}$  endógena, el medio debe contener adicionalmente glicina o serina, puesto que se induce la auxotrofia por serina del microorganismo recombinante. La glicina puede ser proporcionada en forma de glicina purificada, un extracto de levadura que contiene glicina, o triptona. La concentración de glicina en el medio es generalmente 0,1-10 g/l, y, específicamente, 0,5-3 g/l. Además, la serina puede ser proporcionada en forma de serina purificada, un extracto de levadura que contiene serina o triptona. La concentración de serina en el medio es generalmente 0,1-5 g/l, y, específicamente, 0,1-1 g/l.

Además, el medio puede contener una fuente de carbono. Los ejemplos de la fuente de carbono pueden incluir sacáridos y carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden ser utilizadas solas o en combinación con el medio. Ejemplos de una fuente de nitrógeno que puede estar contenida en el medio incluyen fuentes de nitrógeno orgánico, tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maíz macerado, soja y proteína de trigo, y fuentes de nitrógeno inorgánico, tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden utilizar solas o en combinación. Ejemplos de una fuente de fósforo que puede estar contenida en el medio incluyen dihidrógenofosfato de potasio, fosfato de potasio, y sales de sodio correspondientes. Además, el medio puede contener sales metálicas, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Adicionalmente, el medio puede contener también aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Estas fuentes o precursores pueden añadirse al medio por lotes o de manera continua.

Los compuestos tales como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico se pueden añadir al medio de una manera adecuada durante el cultivo para ajustar el pH del medio de cultivo. Además, durante el cultivo, un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso puede ser utilizado para suprimir la formación de espuma. Además, a fin de mantener el medio de cultivo en un estado aeróbico, el oxígeno o gas que contiene oxígeno puede ser inyectado en el medio de cultivo. Para una condición anaeróbica o microaeróbica, nitrógeno, hidrógeno, o dióxido de carbono pueden ser proporcionados sin aireación. El medio de cultivo puede mantenerse normalmente a una temperatura que oscila entre 27 °C a 37 °C, y específicamente de 30 °C a 35 °C. En cuanto al periodo de cultivo, el cultivo podrá continuar hasta que se produzcan cantidades deseadas de sustancias útiles. Específicamente, el periodo de cultivo puede ser de 10-100 horas.

En la presente divulgación, la OPS producida en la etapa de cultivo puede además aislarse y purificarse. Por ejemplo, la OPS deseada puede recogerse a partir del cultivo mediante un método adecuado conocido en la materia dependiendo de un método de cultivo, por ejemplo, un método de cultivo de tipo continuo, un cultivo continuo o un cultivo discontinuo.

En un ejemplo de la presente divulgación, un plásmido que comprende cada una de las cuatro variantes de proteína RhtB se introdujo en una cepa que produce OPS, y acto seguido la cepa se cultivó y la productividad de OPS se examinó. Como resultado, la cepa que produce OPS introducida con el plásmido para cada una de las cuatro variantes de proteína mostró un aumento de la productividad de OPS de hasta el 14 % en comparación con una cepa que produce OPS introducida en un plásmido con la RhtB de tipo silvestre (Ejemplo 2).

Un aspecto adicional de la presente divulgación también incluye un método de producción de cisteína o sus derivados, comprendiendo el método la reacción de OPS, producida por el método de producción de OPS descrito anteriormente, con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

Específicamente, el método de producción de cisteína o sus derivados comprende las etapas que consisten en: a) producir OPS mediante el cultivo de un microorganismo que produce OPS que comprende la variante de proteína RhtB; y b) hacer reaccionar la OPS, producida en la etapa a), con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS, pero no se limita a los mismos. La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático que muestra el proceso para la síntesis de cisteína.

La etapa a) del método es como se ha descrito anteriormente. Además, el método de la presente divulgación comprende la etapa b) de reacción de la OPS, producida en la etapa a), con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

El sulfuro que se utiliza en la presente divulgación puede ser cualquier sulfuro que pueda proporcionarse no solo en una forma sólida que se utiliza generalmente en la materia, sino también en una forma líquida o gaseosa debido a la diferencia de pH, presión y/o solubilidad, y se puede convertir en un grupo tiol (SH) en la forma de, por ejemplo, sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) o tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ). Específicamente, el sulfuro que se utiliza en la presente divulgación puede ser  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaSH}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ ,  $\text{NaSH}$  o  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , que puede proporcionar un grupo tiol con OPS. En la reacción, un

solo grupo tiol se suministra a un solo grupo OPS reactivo para producir una única cisteína o un derivado de la misma. En esta reacción, un sulfuro se añade específicamente en una cantidad de 0,1-3 moles, y específicamente 1-2 moles por mol de OPS. Lo más específicamente, OPS y un sulfuro que proporciona un grupo tiol se utilizan en una relación molar de 1:1 a tenor de la economía.

5 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS)" se refiere a una enzima que cataliza una reacción en la que se proporciona un grupo tiol (SH) de la OPS para convertir OPS en cisteína. La enzima se descubrió primero en *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatics*, y *Trichomonas vaginalis* (Mino K y Ishikawa K, *FEBS letters*, 551: 133-138, 2003; Burns, KE *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 11602-11603, 2005). Además, el alcance de OPSS incluye no solo una proteína OPSS de tipo silvestre, sino también una variante de proteína que comprende una delección, sustitución o adición en uno o más nucleótidos de una secuencia de polinucleótido que codifica la OPSS y muestra una actividad que es igual o mayor que la actividad biológica de la proteína OPSS de tipo silvestre. Además, el alcance de OPSS incluye la proteína OPSS desvelada en la publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2012-0041115 y registro de patente coreana n.º 10-1208267, y sus variantes de proteínas.

Además, el método de la presente divulgación puede comprender además una etapa de aislamiento y purificación de la cisteína producida por la reacción de la etapa b). En la presente memoria, la cisteína deseada se puede recoger al aislar y purificar la solución de reacción utilizando una reacción adecuada conocida en la materia.

Además, la cisteína producida por el método de la presente divulgación se puede sintetizar fácilmente en un derivado de cisteína por una reacción de síntesis química conocida en la materia.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "derivados" se refiere a compuestos similares obtenidos por modificación química de una parte de cualquier compuesto. Por lo general, el término significa compuestos en los que un átomo de hidrógeno o un grupo de átomos son sustituidos con otro átomo de hidrógeno o grupo de átomos.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "derivados de cisteína" se refiere a compuestos en los que un átomo de hidrógeno o grupo de átomos en cisteína se sustituye con otro grupo de átomos o átomos. Por ejemplo, los derivados de cisteína pueden tener una forma en la que el átomo de nitrógeno del grupo amina (-NH<sub>2</sub>) o el átomo de azufre del grupo tiol (-SH) en cisteína tiene otro grupo átomo o átomo unido a él. Ejemplos de derivados de cisteína incluyen, entre otros, NAC (N-acetilcisteína), SCMC (S-carboximetilcisteína), BOC-CYS(ME)-OH, (R)-S-(2-amino-2-carboxietil)-L-homocisteína, ácido (R)-2-amino-3-sulfopropiónico, ácido D-2-amino-4-(etiltio)butírico, 3-sulfino-L-alanina, Fmoc-Cys (Boc-metil)-OH, seleno-L-cistina, S-(2-tiazolil)-L-cisteína, S-(2-tienil)-L-cisteína, S-(4-tolil)-L-cisteína, etc. La cisteína se puede sintetizar fácilmente en NAC (N-acetilcisteína) por reacción con un agente de acetilación, y en condiciones básicas, puede sintetizarse en SCMC (S-carboximetilcisteína) por reacción con ácido haloacético. Estos derivados de cisteína se utilizan principalmente como materiales farmacéuticos, incluidos los remedios para la tos, agentes de alivio de la tos y agentes terapéuticos para bronquitis, asma bronquial y dolor de garganta.

En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Queda entendido, sin embargo, que estos ejemplos son para fines ilustrativos solamente y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente divulgación.

#### 45 **Ejemplo 1: Identificación de variantes de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona)**

A fin de aumentar la especificidad de un exportador de O-fosfoserina (OPS) para aumentar la capacidad secretora de OPS de una cepa que produce OPS, los presentes inventores construyeron variantes de proteína RhtB, que son exportadoras de OPS, de la siguiente manera.

Específicamente, para la construcción de variantes de proteína, el marco de lectura abierto de RhtB se amplificó por PCR por mutagénesis aleatoria (PCR propensa a errores JENA) utilizando el ADN genómico de *Escherichia coli* K12\_W3110, ATCC 27325) como plantilla y un par de cebadores específicos del gen. Cada uno de los fragmentos de genes obtenidos por PCR se escindió con *EcoRV* y *HindIII* y se clonó en un vector pCL Prmf que comprende un promotor de rmf insertado en un vector pCL1920 (GenBank n.º AB236930). En la presente memoria, la amplificación del gen rhtB se realizó utilizando cebadores de las SEQ ID NOS: 8 y 9.

Las bibliotecas de plásmidos recombinantes construidas por el proceso descrito anteriormente se sometieron a una identificación sistemática de alto rendimiento (ISAR). Una cepa de la plataforma para la identificación sistemática fue un microorganismo recombinante mutado para reducir la actividad de la fosfoserina fosfatasa endógena (SerB) en la cepa de *E. coli* de tipo silvestre W3110 y se denominó "CA07-0012" (KCCM11212P; publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2012-0041115).

Para identificar mutantes que tienen una actividad de exportación aumentada de OPS, las bibliotecas de plásmidos construidos se transformaron en CA07-0012 por electroporación, y a continuación, se seleccionaron las colonias que

muestran la eliminación de la inhibición del crecimiento en condiciones de medio que contiene una cantidad excesiva de OPS. Los plásmidos se obtuvieron a partir de las colonias seleccionadas, y las secuencias de nucleótidos de los mismos se analizaron mediante una técnica de secuenciación.

- 5 Como resultado, se seleccionaron las siguientes cuatro variantes de proteína RhtB involucradas en la eliminación de la inhibición del crecimiento en condiciones del medio que contiene una cantidad excesiva de OPS: una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y denominada "RhtB m1"; una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y denominada "RhtB m2"; una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y denominada "RhtB m3"; y una variante de proteína RhtB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y denominada "RhtB m4".

**Ejemplo 2: Examen de las actividades de exportación de OPS de las variantes de proteína rhtB en una cepa que produce OPS**

- 15 Un plásmido que comprende cada una de las cuatro variantes de la proteína identificada en el Ejemplo 1 se introdujo en la cepa que produce OPS CA07-0012, y después se evaluaron las productividades de O-fosfoserina de las cepas resultantes.

- 20 Específicamente, cada una de las cepas se sembró en placas de medio sólido LB y se cultivó durante la noche en una incubadora a 33 °C. Cada una de las cepas cultivadas durante la noche en el medio sólido LB se inoculó en un medio de título de 25 ml mostrado en la Tabla 1 a continuación, y luego se incubó en un cultivo a una temperatura de 34,5 °C y 200 rpm durante 48 horas. Los resultados del cultivo se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 1

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	10 mg
L-glicina	2,5 g
Extracto de levadura	3 g
Fosfato de calcio	30 g
pH	6,8

25

Tabla 2

Nombre de la cepa	DO 562 nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0012/PCL-Prmf-rhtB (ts)	40	35	1,5
CA07-0012/PCL-Prmf-rhtB m1	37	35	1,7
CA07-0012/PCL-Prmf-rhtB m2	41	34	1,8
CA07-0012/PCL-Prmf-rhtB m3	38	35	1,8
CA07-0012/PCL-Prmf-rhtB m4	37	35	1,8

- 30 Como puede observarse en la Tabla 2 anterior, las cepas con las variantes de proteína rhtB de la presente divulgación mostraron excelentes resultados que corresponden a un aumento en la producción de OPS de hasta un 10 % en comparación con una cepa introducida con el gen de rhtB de tipo silvestre.

- 35 Con el fin de verificar las actividades de las variantes de proteína rhtB de la presente divulgación, la cepa CA07-0022/PCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC (KCCM11103P; publicación de patente coreana abierta a exposición pública n.º 10-2012-0041115) que tiene actividades mejoradas de SerA (D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa) y SerC (3-fosfoserina aminotransferasa), que están implicadas en la vía de biosíntesis de OPS, se utilizó como una cepa que produce OPS que tiene una mayor capacidad para producir OPS. Para construir un vector PCL-Prmf-serA (G336V)-serC\_Prmf-genes, el vector PCL-PrhtB-genes se amplificó utilizando cebadores de SEQ ID NOS: 6 y 7.

- 40 Específicamente, cada una de las cepas se sembró en placas de medio sólido LB y se cultivó durante la noche en una incubadora a 33 °C. Cada una de las cepas cultivadas durante la noche en el medio sólido LB se inoculó en un medio de título de 25 ml mostrado en la Tabla 1 a continuación, y luego se incubó en un cultivo a una temperatura de 34,5 °C y 200 rpm durante 48 horas. Los resultados del cultivo se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Nombre de la cepa	DO 562 nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022/PCL Prmf serA*C-Prmf-rhtB (ts)	43	33	2,5
CA07-0022/PCL Prmf serA*C-Prmf-rhtB m1	41	31	2,6
CA07-0022/PCL Prmf serA*C-Prmf-rhtB m2	42	31	2,6

Nombre de la cepa	DO 562 nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022/PCL Prmf serA*C-Prmf-rhtB m3	42	32	3,0
CA07-0022/PCL Prmf serA*C-Prmf-rhtB m4	41	31	2,6

5 Como puede observarse en la Tabla 3 anterior, cuando se introdujeron las variantes de proteína rhtB de la presente divulgación en la cepa que produce OPS que tiene una capacidad mejorada para producir OPS, la producción de OPS en la cepa se incrementó hasta en un 14 %, lo que sugiere que las variantes de proteína rhtB de la presente divulgación son útiles para la producción de OPS.

10 Además, la cepa CA07-0022/PCL Prmf serA\*C-Prmf-rhtB m1 que es una cepa típica introducida con la variante de proteína rhtB que tiene una actividad de exportación mejorada de OPS se denominó "*Escherichia coli* CA07-0227" y depositó ante el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocido como autoridad de depósito internacional en virtud del Tratado de Budapest, el 7 de marzo de 2013 con el número de acceso KCCM11398P.

<110> CJ CheilJedang Corporation

15 <120> Nuevas variantes de la proteína RhtB y método de producción de O-fosfoserina utilizando las mismas

<130> OPA14016-PCT

<150> KR 10-2013-0053428

20 <151> 10-05-2013

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

25 <210> 1

<211> 206

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

30 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(206)

<223> rhtB (transportadora de eflujo de homoserina/homoserina lactona)

35 <400> 1

ES 2 670 035 T3

Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr Ser Ile Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met Thr Thr Ser Leu  
 20 25 30  
 Asn His Gly Tyr Arg Gly Ala Val Ala Ser Ile Ala Gly Leu Gln Thr  
 35 40 45  
 Gly Leu Ala Ile His Ile Val Leu Val Gly Val Gly Leu Gly Thr Leu  
 50 55 60  
 Phe Ser Arg Ser Val Ile Ala Phe Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Ile Trp Leu Gly Ile Gln Gln Trp Arg Ala Ala Gly Ala  
 85 90 95  
 Ile Asp Leu Lys Ser Leu Ala Ser Thr Gln Ser Arg Arg His Leu Phe  
 100 105 110  
 Gln Arg Ala Val Phe Val Asn Leu Thr Asn Pro Lys Ser Ile Val Phe  
 115 120 125  
 Leu Ala Ala Leu Phe Pro Gln Phe Ile Met Pro Gln Gln Pro Gln Leu  
 130 135 140  
 Met Gln Tyr Ile Val Leu Gly Val Thr Thr Ile Val Val Asp Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Val Met Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Ala Gln Arg Ile Ala Leu Trp Ile  
 165 170 175  
 Lys Gly Pro Lys Gln Met Lys Ala Leu Asn Lys Ile Phe Gly Ser Leu  
 180 185 190  
 Phe Met Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg His Ala

195

200

205

- <210> 2
- <211> 206
- 5 <212> PRT
- <213> *Escherichia coli*
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(206)
- <223> rhtB (transportadora de eflujo de homoserina/homoserina lactona) m1
- <400> 2

ES 2 670 035 T3

Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Met Thr Ser Ile Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met Thr Thr Ser Leu  
 20 25 30  
 Asn His Gly Tyr Arg Gly Ala Val Ala Ser Ile Ala Gly Leu Gln Thr  
 35 40 45  
 Gly Leu Ala Ile His Ile Ala Leu Val Gly Val Gly Leu Gly Thr Leu  
 50 55 60  
 Phe Ser Arg Ser Val Ile Ala Phe Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Ile Trp Leu Gly Ile Gln Gln Trp Arg Ala Ala Gly Ala  
 85 90 95  
 Ile Asp Leu Lys Ser Leu Ala Ser Thr Gln Ser Arg Arg His Leu Phe  
 100 105 110  
 Gln Arg Ala Val Phe Val Asn Leu Thr Asn Pro Lys Ser Ile Val Phe  
 115 120 125  
 Leu Ala Ala Leu Phe Pro Gln Phe Ile Met Pro Gln Gln Pro Gln Leu  
 130 135 140  
 Met Gln Tyr Ile Val Leu Gly Val Thr Thr Ile Val Val Asp Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Val Met Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Ala Gln Arg Ile Ala Leu Trp Ile  
 165 170 175  
 Lys Gly Pro Lys Gln Met Lys Ala Leu Asn Lys Ile Phe Gly Ser Leu  
 180 185 190  
 Phe Met Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg His Ala  
 195 200 205

<210> 3  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

5

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(206)  
 <223> rhtB (transportadora de eflujo de homoserina/homoserina lactona) m2

10

<400> 3

ES 2 670 035 T3

Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr Ser Ile Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met Thr Thr Ser Leu  
 20 25 30  
 Asn His Gly Tyr Arg Gly Ala Val Ala Ser Ile Ala Gly Leu Gln Thr  
 35 40 45  
 Gly Leu Ala Ile His Met Val Leu Val Gly Val Gly Leu Gly Thr Leu  
 50 55 60  
 Phe Ser Arg Ser Val Ile Ala Phe Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Ile Trp Leu Gly Ile Gln Gln Trp Arg Ala Ala Gly Ala  
 85 90 95  
 Ile Asp Leu Lys Ser Leu Ala Ser Thr Gln Ser Arg Arg His Leu Phe  
 100 105 110  
 Gln Arg Ala Val Phe Val Asn Leu Thr Asn Pro Lys Ser Ile Val Phe  
 115 120 125  
 Leu Ala Ala Leu Phe Pro Gln Phe Ile Met Pro Gln Gln Pro Gln Leu  
 130 135 140  
 Met Gln Tyr Ile Val Leu Gly Val Thr Thr Ile Val Val Asp Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Val Met Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Ala Gln Arg Ile Ala Leu Trp Ile  
 165 170 175  
 Lys Gly Pro Lys Gln Met Lys Ala Leu Asn Lys Ile Phe Gly Ser Leu  
 180 185 190  
 Phe Met Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg His Ala  
 195 200 205

<210> 4  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(206)  
 <223> rhtB (transportadora de eflujo de homoserina/homoserina lactona) m3

<400> 4

Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr Ser Ile Ile Leu

ES 2 670 035 T3

1					5						10					15
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Met	Thr	Thr	Ser	Leu	
			20					25						30		
Asn	His	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ile	Ala	Gly	Leu	Gln	Thr	
		35					40					45				
Gly	Leu	Ala	Ile	His	Ile	Val	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu	
	50					55					60					
Phe	Ser	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	
	65				70					75					80	
Ala	Tyr	Leu	Ile	Trp	Leu	Gly	Ile	Gln	Gln	Trp	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala	
				85					90					95		
Ile	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg	His	Leu	Phe	
			100					105					110			
Gln	Arg	Ala	Val	Leu	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Pro	Lys	Ser	Ile	Val	Phe	
		115					120					125				
Leu	Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Gln	Phe	Ile	Met	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Leu	
	130					135					140					
Met	Gln	Tyr	Ile	Val	Leu	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Thr	
	145				150					155				160		
Val	Met	Ile	Gly	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ala	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu	Trp	Ile	
				165					170					175		
Lys	Gly	Pro	Lys	Gln	Met	Arg	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	
			180					185					190			
Phe	Met	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	His	Ala			
		195					200					205				

<210> 5  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*

5

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(206)  
 <223> rhtB (transportadora de eflujo de homoserina/homoserina lactona) m4

10

<400> 5

Met	Thr	Leu	Glu	Trp	Trp	Phe	Ala	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Leu	
	1			5					10					15		
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Ala	Met	Thr	Thr	Ser	Leu	
			20					25						30		
Asn	His	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ile	Ala	Gly	Leu	Gln	Thr	
		35					40					45				
Gly	Leu	Ala	Ile	His	Ile	Val	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu	

15

ES 2 670 035 T3

	50		55		60														
	Phe	Ser	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala			
	65					70					75					80			
	Ala	Tyr	Met	Ile	Trp	Leu	Gly	Ile	Gln	Gln	Trp	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala			
				85					90						95				
	Ile	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg	His	Leu	Phe			
			100						105					110					
	Gln	Arg	Ala	Val	Phe	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Pro	Lys	Ser	Ile	Val	Phe			
			115					120					125						
	Leu	Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Gln	Phe	Ile	Met	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro			
			130				135					140							
	Met	Gln	Tyr	Ile	Val	Leu	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Ile			
	145					150					155								
	Glu	Met	Ile	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu	Trp	Ile			
				165						170					175				
	Lys	Gly	Pro	Lys	Gln	Met	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu			
				180					185					190					
	Phe	Met	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	His	Ala					
			195					200					205						

5 <210> 6  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador para amplificación de pCL-PrhtB-genes para construir pCL-Prmf-serA(G336V)-serC\_Prmf-genes

<400> 6  
 aagcttggg cctctcgct attacgc 27

15 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador para amplificación de pCL-PrhtB-genes para construir pCL-Prmf-serA(G336V)-serC\_Prmf-genes

25 <400> 7  
 aagcttaggc ttaccgctc tactgtc 27

30 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador para amplificación de rhtB para construir pCL-Prmf-rhtB

35 <400> 8

## ES 2 670 035 T3

gcgataatcat gaccttagaa tggtagg 26

<210> 9

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador para amplificación de rhtB para construir pCL-Prmf-rhtB

<400> 9

gctctagatc acgcatgcct cgc 23

**REIVINDICACIONES**

1. Una variante de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) que tiene una actividad de exportación mejorada de O-fosfoserina (OPS),  
5 en la que la variante de proteína tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4 o 5.
2. Un polinucleótido que codifica la variante de proteína de la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2.  
10
4. Un microorganismo que produce O-fosfoserina que comprende la variante de proteína RhtB (transportadora de exportación de homoserina/homoserina lactona) de la reivindicación 1.
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo tiene además una actividad  
15 reducida de fosfoserina fosfatasa endógena (SerB).
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo tiene además una actividad mejorada de fosfoserina aminotransferasa (SerC) o fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) resistente a una inhibición por retroalimentación de la serina.  
20
7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo tiene una actividad mejorada de la variante de proteína RhtB.
8. Un método de producción de O-fosfoserina (OPS), que comprende el cultivo del microorganismo de una  
25 cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
9. Un método de producción de cisteína o sus derivados, que comprende las etapas que consisten en:  
30     a) cultivar el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para producir O-fosfoserina (OPS);  
      y  
      b) hacer reaccionar la OPS, producida en la etapa a), con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el sulfuro es uno o más seleccionado entre el grupo que  
35 consiste en Na<sub>2</sub>S, NaSH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

[Fig. 1]

