

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 964**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015** **E 19175665 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021** **EP 3556847**

54 Título: **Cepa de microorganismos y procedimiento para la producción fermentativa exenta de antibióticos de sustancias y proteínas de bajo peso molecular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2021**

73 Titular/es:  
**WACKER CHEMIE AG (100.0%)**  
**Hanns-Seidel-Platz 4**  
**81737 München, DE**

72 Inventor/es:  
**BORNHÖVD, CARSTEN y**  
**THÖN, MARCEL**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 867 964 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**

Cepa de microorganismos y procedimiento para la producción fermentativa exenta de antibióticos de sustancias y proteínas de bajo peso molecular

5 La invención se refiere a una cepa de microorganismos y a un procedimiento para la producción fermentativa exenta de antibióticos de sustancias y proteínas de bajo peso molecular. La invención se expone en la parte de reivindicaciones adjunta.

10 La producción natural de sustancias de bajo peso molecular con ayuda de microorganismos ha aumentado en principio, y también ha crecido considerablemente en el mercado de productos farmacéuticos recombinantes ("productos biológicos") en los últimos años. Debido a la fuerte presión de costes en la producción fermentativa, en especial para productos activos farmacéuticos a base de proteínas, se buscan continuamente procedimientos y sistemas más eficientes, y de este modo más económicos, para su producción. Como productores se pueden emplear diversos microorganismos, como bacterias, levaduras, hongos filamentosos o también células vegetales o células animales. En este caso desde el punto de vista de la rentabilidad es esencial una fermentación económica, rendimientos de producto elevados y, en el caso de proteínas, un correcto plegamiento, o bien  
15 modificación, que conduce a una proteína funcional. Debido a su muy bien estudiada genética y fisiología, al tiempo de generación corto y al fácil manejo, la enterobacteria gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) es actualmente el organismo empleado con mayor frecuencia para la producción de sustancias y proteínas de bajo peso molecular.

20 En principio se emplean dos microorganismos diferentes, que producen las sustancias de manera natural y aquellos que se modificaron genéticamente. Los procedimientos técnicos necesarios para la modificación genética son conocidos en el estado de la técnica desde hace tiempo. En este caso, el objetivo es introducir los genes, que son necesarios para las proteínas objetivo, o bien para la síntesis de sustancias de bajo peso molecular, en la célula huésped. Estos se transcriben por la célula huésped, se trasladan, se modifican si es necesario, y eventualmente se descargan en el medio.

25 La rentabilidad de un procedimiento biotecnológico depende decisivamente de los rendimientos de producto obtenidos. Estos se pueden optimizar mediante el sistema de expresión (célula huésped, elementos genéticos, etc.), los parámetros de fermentación y los medios nutrientes.

30 Las células huésped se pueden modificar fundamentalmente de dos maneras. De este modo, la nueva información genética se puede integrar en el genoma (hongos filamentosos, levaduras, etc.) y/o en un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmido) (procariotas, levaduras, etc.). En la integración genética de los genes en el genoma, estos se conservan convenientemente en la célula huésped también sin presión de selección. No obstante, es desfavorable que, en el caso de procariotas, solo una copia del gen está presente en el huésped, y la integración de otras copias del mismo gen para el aumento de la formación de productos a través del efecto de la dosis de gen es muy exigente debido a los resultados de recombinación específicos de la secuencia (EP 0284126 B1).  
35

40 En la utilización de ADN extracromosómico, la información de la proteína objetivo en forma de un plásmido se transforma generalmente en la cepa de producción de *E. coli*. Ya que también aquí actúa el efecto de la dosis de gen, se desea un número lo más elevado posible de copias de plásmido por célula. Ya que, debido a la carga, tal elemento genético se pierde fácilmente de la célula tanto debido a la replicación del plásmido como también debido a la producción de la proteína objetivo, a través del cultivo total se debe ejercer una presión de selección. Como marcadores de selección se emplean por defecto genes de resistencia a antibióticos que permiten de este modo un crecimiento en presencia de antibióticos a la célula que presenta tal elemento. Por consiguiente, solo se pueden propagar las células que portan un plásmido. Ya que debido a la pérdida de plásmido también se pierde la capacidad de producción de la sustancia objetivo, o bien de la proteína objetivo, esto tiene un efecto directo  
45 sobre los rendimientos que se pueden obtener en la fermentación.

50 El empleo de resistencias a antibióticos como marcador de selección se ha considerado cada vez más crítico en los últimos años. Por una parte, el empleo de antibióticos es bastante caro, en especial si la resistencia se basa en una enzima que degrada antibióticos, ya que el antibiótico se debe dosificar posteriormente de manera constante. Por otra parte, el empleo ampliamente extendido en la medicina y otros campos contribuye a la propagación de los genes de resistencia a otras cepas parcialmente patógenas. Esto tiene consecuencias negativas para el tratamiento de enfermedades.

Entretanto, en el estado de la técnica también se han desarrollado sistemas de selección exentos de antibiótico. Se desarrollaron diferentes sistemas exentos de antibiótico. Estos se pueden subdividir en tres sistemas básicos diferentes. El empleo de auxotrofías, sistemas toxina-antitoxina y otros procedimientos.

Corresponden a la categoría de otros procedimientos mecanismos que no siguen ningún principio general, por ejemplo t-RNAs supresor *fab I*/triclosán (síntesis de FA), titración operador/represor (Peubez et al. *Microbial Cell Fac*, 2010, 9:65). No obstante, estos procedimientos se emplean generalmente para la síntesis de ADN y fragmentos de ADN para la terapia génica, y no están optimizados para la producción de rendimientos elevados de sustancias objetivo. En lugar de antibióticos, para la selección se emplean en parte otras sustancias, por ejemplo, triclosán, herbicidas y metales pesados, que también están sujetos, no obstante, a objeciones sanitarias. De este modo, por ejemplo, por Herrero et al. (1990, *J.Bacteriol.* 172, 6557-6567) se describen genes de resistencia contra herbicidas y metales pesados como marcadores de selección.

Los sistemas toxina-antitoxina (Hok-Sok, *ccdA/B* etc.) están constituidos por dos elementos genéticos que pueden estar codificados tanto en el plásmido, como también cromosómicamente y en el plásmido (Gerdes et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:3116-20). En este caso, la antitoxina actúa neutralizando la toxina. En el caso de pérdida del plásmido, este mecanismo falla y la célula exenta de plásmido muere debido a la toxina codificada cromosómicamente, o bien de larga vida.

Otro método conocido para la selección es la complementación de cepas auxótrofas. En este caso, en el genoma de la cepa producción se eliminan o bien se desactivan genes que tienen funciones esenciales en el metabolismo. Correspondientemente, tales genes se denominan genes esenciales. Las cepas auxótrofas producidas de este modo pueden crecer, propagarse o sobrevivir solo si la función metabólica se evita o se produce de nuevo. Esto se puede conseguir tanto mediante alimentación de correspondientes precursores o productos finales del metabolismo (aminoácidos, bases, etc.) o mediante introducción del gen que se desactivó en el genoma huésped. La patente EP 0284126 B1 cita marcadores de auxotrofia del metabolismo de aminoácidos. Ya que las auxotrofías se pueden suplementar mediante adición del producto metabólico necesario en el medio, estas cepas se pueden generar fácilmente. Las células se pueden cultivar entonces en presencia del producto metabólico también sin plásmido. Mediante transformación se introduce de nuevo en la célula la información para la síntesis de aminoácido/base, y la célula puede crecer también sin suplementación. Correspondientemente, la selección en medios mínimos se puede efectuar sin el suplemento.

Hasta el momento, en la práctica no se pudo imponer el empleo de tales auxotrofías como marcadores de selección, ya que en la fermentación industrial se emplean habitualmente medios con composición compleja. En este caso, por regla general por motivos de costes, las sustancias residuales son componente del medio de fermentación, como por ejemplo residuos de cereales (producción de etanol), maíz, (producción de almidón), patatas (obtención de almidón), o extracto de levadura. Estos sirven como fuentes tanto de carbono como también de nitrógeno. En parte, estos componentes no se definen exactamente, pero contienen aminoácidos, bases, vitaminas, etc., que se pueden absorber a partir del medio. Por lo tanto, en la fermentación industrial es difícil, si no imposible, desarrollar una presión de selección suficiente con cepas auxótrofas.

Tampoco el empleo de una auxotrofia en el metabolismo de glucosa, como se describe en el documento WO 2008/135113 A1, tiene una selectividad suficiente en los medios empleados industrialmente. Si bien los microorganismos pueden crecer especialmente bien y propagarse más rápidamente en glucosa que lo que es el caso en medios con otras fuentes de C, esta ventaja se suprime de nuevo debido a la carga más elevada debida al plásmido, o bien a la producción de la sustancia objetivo. Otras fuentes de C se encuentran disponibles en medios complejos y se emplean por las células.

Esto se considera también para el empleo del gen *pyrC* (dihidrorotasa) descrito en el documento WO 07039632 A1 como marcador de auxotrofia. Esta enzima se encuentra al comienzo de la síntesis de bases de pirimidina y la desactivación conduce también a la inhibición de la síntesis de nuevo. No obstante, las bases se pueden absorber y utilizar a partir del medio y no desarrollan una correspondiente presión de selección en medios industriales.

Representan excepciones auxotrofías para la timidina y D-alanina esencial, que se presentan también en componentes complejos únicamente en trazas o incluso no se presentan en los medios de fermentación (EP 0251579 A1; EP 0185512 B1). No obstante, tampoco estos sistemas son apropiados para la producción eficiente en el procedimiento de alta densidad celular, que se desea por regla general. Ya que en este procedimiento las células mueren y sufren lisis parcialmente, correspondientemente se liberan timidina y D-alanina, o bien otros aminoácidos, etc., que pueden suplementar a su vez las auxotrofías.

En total se debe determinar que, a pesar de la experiencia de años para la producción fermentativa de sustancias y proteínas de bajo peso molecular, hasta el momento no se desarrolló un sistema empleable universalmente, excepto aquel a través de sustancias costosas o cuestionables desde el punto de vista sanitario, o bien ecológico, como antibióticos. Debido a los medios de crecimiento complejos empleados en la industria, también los diferentes métodos para la selección a través de marcadores de auxotrofia han llevado a resultados insuficientes hasta la fecha.

Esto se considera en principio para microorganismos, pero en especial para cepas de producción menos robustas, como por ejemplo cepas permeables, que se utilizan en base a sus propiedades especiales (liberación de proteínas en el medio). En la utilización industrial de estas cepas a escala técnica se emplean habitualmente componentes complejos en el medio.

5 La utilización de medios definidos a partir de componentes purificados no es rentable para la producción de productos utilizados industrialmente por motivos de costes.

Es tarea de la invención poner a disposición una cepa de microorganismos para la producción de sustancias o proteínas de bajo peso molecular, que permanezca estable también en medios con componentes complejos y en la que el plásmido de producción no se establezca mediante un sistema antibiótico/marcador de resistencia en la  
10 célula.

Esta tarea se soluciona mediante una cepa de microorganismos que contiene en su genoma una mutación en un gen, que provoca una auxotrofia de la cepa, así como un plásmido de producción que codifica al menos una enzima para la producción de una sustancia de bajo peso molecular o al menos una proteína recombinante, así como una copia funcional del gen, cuya desactivación cromosómica provoca la auxotrofia, caracterizada por que,  
15 en el caso de la auxotrofia, se trata de una auxotrofia no alimentable y se trata del gen pyrH o sus genes homólogos.

En el ámbito de la invención, se debe entender por una auxotrofia no alimentable el hecho de que la auxotrofia reduzca el crecimiento de células de microorganismos o provoque la muerte de las células de microorganismos, y no sea suplementable mediante adición de productos previos, intermedios y/o finales específicos del  
20 metabolismo en el medio de crecimiento.

En el sentido de la invención, se presenta un crecimiento reducido si la tasa de crecimiento de la cepa en una fermentación se reduce tras la mutación del gen en comparación con la tasa de crecimiento de la cepa antes de la mutación del gen a  $\leq 10\%$ , preferentemente si ya no tiene lugar más crecimiento. De modo especialmente preferente, la mutación conduce a la desactivación de un gen, provoca de este modo una auxotrofia no alimentable y de este modo la muerte de la célula de microorganismo. Por consiguiente, en el genoma de una célula de la cepa de microorganismos está desactivado un gen que es esencial para una vía de metabolismo anabólica necesaria para el crecimiento o la supervivencia de las células, no pudiéndose obtener de nuevo crecimiento o supervivencia de la célula mediante adición de productos previos, intermedios y/o finales específicos del  
25 metabolismo en el medio de crecimiento.

30 Un gen de auxotrofia no alimentable en el sentido de la invención es un gen en el genoma de una célula de microorganismo cuya desactivación no se puede complementar mediante adición de productos previos, intermedios y/o finales específicos del metabolismo en el medio de crecimiento, y cuya desactivación conduce a una tasa de crecimiento reducida o a la muerte de la célula de microorganismo.

35 La mutación del gen, que provoca la auxotrofia no alimentable de la cepa, conduce preferentemente a la desactivación de este gen o a la desactivación de la actividad del producto génico codificado a través del gen.

Se describen ejemplos de genes de auxotrofia no alimentables (genes letales) en Baba et al. (2006, Mol. Syst. Biol. 2:2006.0008). Según la invención se trata de pyrH o sus genes homólogos. Según la invención se trata del gen pyrH o genes homólogos con la misma función, o bien actividad.

40 Además del segmento de ADN que se transcribe, un gen en el sentido de la presente invención comprende también los segmentos de ADN que participan en la regulación de este proceso de copia, es decir, los elementos reguladores del gen, como preferentemente promotores y terminadores.

Por genes homólogos se debe entender preferentemente genes que codifican para una proteína con la misma actividad que la proteína codificada por el citado gen y presentan una identidad de secuencia mayor que el 30 %, de modo especialmente preferente mayor que el 70 %, respecto a las secuencias de los citados genes en el  
45 respectivo microorganismo, conocidas por bancos de datos en cada caso.

El gen pyrH codifica para la enzima UMP-quinasa (EC: 2.7.4.22; UK, uridina monofosfato quinasa, uridilato quinasa, uridina 5'-monofosfato (UMP) quinasa). Esta enzima activa UMP para dar UDP bajo empleo de ATP. En un paso siguiente se activa UDP por otra quinasa (UDP-quinasa) para dar UTP, que se puede emplear tanto para la síntesis de ARN como también para la síntesis de CTP (citosina trifosfato) y TTP (timidina trifosfato). CTP y TTP son a su vez componente de RNA (CTP) y DNA (dCTP y dTTP). De este modo, UMP es el origen de componentes de pirimidina de ARN y ADN. Ya que una transformación de uracilo en citosina o timidina se efectúa solo en el plano del trifosfato, una desactivación de UMP-quinasa conduce a un bloqueo completo de esta vía de síntesis.  
50

En principio, la célula puede absorber solo los monofosfatos de las tres bases a partir del medio. Para la transformación de UMP en UTP es esencial la UMP-quinasa. De este modo, esta auxotrofia no es suplementable mediante alimentación y, por lo tanto, es independiente de la composición del medio.

El gen *pyrH* está caracterizado por SEQ ID nº 1. El producto génico *pyrH* (PyrH) está caracterizado por SEQ ID nº 2.

5 En el ámbito de la presente invención, los homólogos de *pyrH* son genes que codifican para una proteína con actividad PyrH y presentan una identidad de secuencia mayor que 30 % respecto a SEQ ID nº 1. Es especialmente preferente una identidad de secuencia mayor que 70% respecto a SEQ ID nº 1. De modo especialmente preferente se trata del gen *pyrH*.

10 Los homólogos de PyrH son proteínas con una identidad de secuencia mayor que 30 % respecto a SEQ ID nº 2, que presentan una actividad de UMP-quinasa según el número EC 2.7.4.22. De modo especialmente preferente, los homólogos de PyrH presentan una actividad de UMP-quinasa según el número EC 2.7.4.22 y una identidad de secuencia mayor que 70 % respecto a SEQ ID nº 2. De modo especialmente preferente se trata de la proteína PyrH.

La actividad de PyrH en una célula se puede determinar correspondientemente al ensayo descrito por Bucurenci et al. (1998, J. Bact. 180: 473-77).

15 El grado de identidad de ADN se determina mediante el programa "nucleotide blast", disponible en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, que se basa en el algoritmo de blastn. Como parámetro de algoritmo para un alineamiento de dos o más secuencias de nucleótidos se utilizaron los parámetros ajustados previamente. Los parámetros generales ajustados previamente son: secuencias objetivo máximas = 100; consultas breves = "Automatically adjust parameters for short input sequences"; umbral esperado = 10; tamaño de palabra = 28; parámetros de ajuste automático para secuencias cortas de entrada = 0. Los correspondientes parámetros de puntuación ajustados previamente son: calificaciones de coincidencia/discordancia = 1, -2; costes de espacio: lineales.

25 Para la comparación de secuencias proteicas se utiliza el programa "protein blast", en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Este programa recurre al algoritmo de blastp. Como parámetro de algoritmo para un alineamiento de dos o más secuencias de nucleótidos se utilizaron los parámetros ajustados previamente. Los parámetros generales ajustados previamente son: secuencias objetivo máximas = 100; consultas breves = "Automatically adjust parameters for short input sequences"; umbral esperado = 10; tamaño de palabra = 3; parámetros de ajuste automático para secuencias cortas de entrada = 0. Los correspondientes parámetros de puntuación ajustados previamente son: matriz = BLOSUM62; costes de espacio = existencia: 11 extensión: 1; ajustes de composición = ajuste de matriz de calificación de composición condicional.

35 Para la producción de una cepa según la invención se introduce un plásmido sensible a la temperatura en una cepa de microorganismos apropiada, que posee una copia funcional de un gen de auxotrofia no alimentable, que se debe mutar o eliminar. A continuación, se desactiva el correspondiente gen de auxotrofia no alimentable en el genoma de la cepa. En esta cepa se sustituye a continuación el plásmido sensible a la temperatura por un plásmido de producción a temperatura no permisiva, conteniendo el plásmido de producción, que codifica al menos una enzima para la producción de una sustancia de bajo peso molecular o al menos una proteína recombinante, también una copia funcional del gen de auxotrofia no alimentable.

40 Mediante este procedimiento se asegura que el plásmido de producción se mantenga en la célula de manera estable durante un proceso de fermentación para la producción de compuestos de bajo peso molecular o de proteínas recombinantes, también en medios complejos. Por consiguiente, las cepas según la invención se pueden cultivar sin pérdida de plásmido en ausencia de un agente selectivo añadido, o bien de un aditivo que compensa una auxotrofia.

45 Como cepa de partida para la producción de una cepa según la invención, en principio es apropiada cualquier cepa de microorganismos que posea un gen, cuya desactivación conduzca a una auxotrofia no alimentable de la cepa.

En el caso de la cepa de partida para la generación de una cepa según la invención se trata preferentemente de una cepa de enterobacterias, de modo especialmente preferente de una cepa de la especie *Escherichia coli*.

50 En el caso de las cepas de *E. coli* son preferentes aquellas que presentan una mutación "permeable". Se debe entender por una "mutación permeable" una mutación en un gen para un elemento estructural de la membrana celular externa o de la pared celular, seleccionado a partir del grupo de genes omp, genes tol, gen excD, gen excC, gen lpp, gen pal, genes env y genes lky, que conduce a que las células desprendan en el medio proteínas periplasmáticas de manera acrecentada (Shokri et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (2003), 654-664). Preferentemente se trata de una mutación "permeable" en el gen lpp, de modo especialmente preferente de una

mutación seleccionada a partir del grupo mutación lpp1, mutación de delección de lpp y mutación del resto glicina en posición 14 de la proteína Lpp (en recuento incluyendo señal peptídica), como por ejemplo la mutación lpp-3. Una mutación lpp1 es una mutación en el gen lpp, que conduce a una sustitución del resto arginina en posición 77 por un resto cisteína, una mutación lpp3 es una mutación en el gen lpp, que conduce a una sustitución del resto glicina en posición 14 por un resto ácido aspártico. Estas mutaciones se describen detalladamente en el documento US2008254511. En el caso de la mutación lpp se trata preferentemente de una delección de al menos un nucleótido en el propio gen lpp o en la región de promotor del gen lpp, que conduce a que las células presenten una permeabilidad elevada para proteínas periplasmáticas.

En el sentido de la presente invención, se debe entender por permeabilidad elevada el hecho de que, tras una fermentación de las células, en el medio nutriente se presente una concentración de proteínas periplasmáticas, por ejemplo, de fosfatasa alcalina, más elevada que en el caso de una fermentación de la cepa de E. coli W3110 (ATCC 27325) bajo las mismas condiciones.

En el estado de la técnica son conocidos procedimientos para la desactivación de un gen en una cepa de microorganismos. Estos se describen de manera detallada a continuación para la mutación del gen pyrH, así como sus productos génicos. Análogamente, estos procedimientos son aplicables también para otros genes, cuya desactivación provoca una auxotrofia no alimentable de una cepa de microorganismos. El plásmido sensible a la temperatura contiene un origen de replicación sensible a la temperatura y una copia funcional del gen de auxotrofia no alimentable. Este plásmido contiene además un gen marcador de selección para la selección de transformantes. En el caso del marcador de selección se trata, a modo de ejemplo, de una resistencia a antibióticos.

Un ejemplo preferente de un origen de replicación sensible a la temperatura es "oriR101 & repA101-ts", un derivado del origen de replicación del plásmido pSC101 (Hashimoto-Gotoh et al.; Gene, 2000, 241:1:185-191), que está localizado, entre otros, en los plásmidos pKD20 y pKD46 (Datsenko und Wanner, 2000, P.N.A.S. 97: 6640-6645).

El plásmido sensible a la temperatura se introduce en la célula con una técnica de transformación conocida por el especialista, por ejemplo, método de TSS, CaCl/RbCl, electroporación.

En células que contienen el plásmido sensible a la temperatura se selecciona por medio del marcador de selección que está presente en el plásmido sensible a la temperatura, mientras que las células se incuban a temperatura permisiva para el plásmido.

Tal plásmido sensible a la temperatura se puede sustituir por el plásmido de producción, cultivándose la cepa de microorganismos tras la transformación con el plásmido de producción a una temperatura no permisiva para el plásmido sensible a la temperatura. Un intervalo de temperaturas no permisivo preferente es 37-45°C, de modo especialmente preferente 39-43°C.

El plásmido de producción se introduce en la célula con una técnica de transformación conocida por el especialista, por ejemplo, método de TSS, CaCl/RbCl, electroporación.

El cultivo de los transformantes se puede efectuar tanto en placas de agar como en cultivo líquido. En una forma de realización preferente, la cepa de microorganismos se expone a un shock térmico a 47-55°C, preferentemente a 52°C, durante 30-90 min, de modo preferente 60 min, inmediatamente tras la transformación con el plásmido de producción. A continuación, se efectúa la incubación ulterior a la temperatura no permisiva citada anteriormente. De este modo, en un paso se sustituye el plásmido sensible a la temperatura por el plásmido de producción, y se genera una cepa de producción según la invención para la producción exenta de antibióticos de sustancias de bajo peso molecular o proteínas recombinantes.

Como plásmido de producción se emplea, a modo de ejemplo, uno de los siguientes vectores de expresión conocidos: pJF118EH, pKK223-3, pUC18, pBR322, pACYC184, pASK-IBA3 o pET.

Además de la copia funcional de gen de auxotrofia no alimentable, el plásmido de producción contiene uno o varios genes objetivo, así como las señales de expresión necesarias para la expresión de estos genes objetivo, como por ejemplo secuencias de promotor, operador y terminador. Los genes objetivo codifican para al menos una enzima para la producción de una sustancia de bajo peso molecular o al menos una proteína recombinante. En el caso de las sustancias de bajo peso molecular se trata de componentes básicos (bases, aminoácidos, ácidos grasos, etc.), así como metabolitos secundarios (vitaminas, antioxidantes, etc.) que puede sintetizar el organismo. Son preferentes aminoácidos, de modo especialmente preferente los aminoácidos L-cisteína y compuestos derivados de estos.

En el caso de las proteínas recombinantes se trata preferentemente de proteínas heterólogas.

Se debe entender por una proteína heteróloga una proteína que no pertenece al proteoma, es decir, la dotación de proteína natural total, del organismo huésped.

En el caso de la proteína heteróloga se trata preferentemente de una proteína eucariótica, de modo especialmente preferente una proteína que contiene uno o varios puentes disulfuro o que se presenta en su forma funcional como dímero o multímero, es decir, la proteína posee una estructura cuaternaria y está constituida por subunidades idénticas (homólogas) no idénticas (heterólogas).

Una clase preferente de proteínas, que está constituida por varias subunidades proteicas, son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Son especialmente preferentes fragmentos de anticuerpos Fab.

En lo sucesivo se describe la producción de una cepa de microorganismos en la que el gen de auxotrofia no alimentable *pyrH* ha mutado.

Como cepas de partida para la producción de una cepa de microorganismos con una desactivación de *pyrH* genómica, en principio es apropiado cualquier organismo huésped que posea un gen para la UMP-quinasa *PyrH*.

En el estado de la técnica son conocidos procedimientos para la desactivación del gen *pyrH* en una cepa de microorganismos. El gen *pyrH* se puede desactivar, a modo de ejemplo, introduciéndose una mutación (sustitución, inserción o delección de uno o varios nucleótidos) en los marcos de lectura del gen *pyrH*, que conduce a que se desactive la actividad específica de *PyrH*. El especialista conoce procedimientos para la generación de tales alelos *pyrH*. De este modo, por ejemplo, por medio del procedimiento descrito en Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-37), la introducción de mutaciones cromosómicas en un gen se puede efectuar a través del mecanismo de recombinación homóloga. La delección cromosómica del gen *pyrH* total o de una parte de este es posible, a modo de ejemplo, con ayuda del sistema de  $\lambda$ -Red recombinasa según el método descrito por Datsenko und Wanner (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-5). Los alelos *pyrH* se pueden transferir a una cepa de tipo salvaje *pyrH* también a través de una transducción por medio de fagos P1 o conjugación a partir de una cepa con mutación *pyrH*, sustituyéndose el gen de tipo salvaje *pyrH* en el cromosoma por el correspondiente alelo *pyrH*.

Además, el gen *pyrH* de una célula se puede desactivar también mutándose al menos un elemento necesario para la regulación de la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, punto de unión de ribosomas) mediante sustitución, inserción o delección de uno o varios nucleótidos. Se presenta una desactivación en el sentido de la invención si la tasa de crecimiento de las células en una fermentación se reduce a  $\leq 10\%$  mediante la desactivación del gen en comparación con las células antes de la mutación, preferentemente si ya no tiene lugar un crecimiento. De modo especialmente preferente, la mutación conduce a la muerte de la célula de microorganismo.

Ya que la desactivación del gen *pyrH* conduce a una auxotrofia no alimentable, en la célula debe estar presente una copia funcional del gen *pyrH* ya antes de la desactivación cromosómica. Esto se puede conseguir mediante la introducción transiente de un plásmido sensible a la temperatura que contiene una copia funcional del gen *pyrH*.

En tales células que contienen el plásmido sensible a la temperatura se puede desactivar ahora el gen *pyrH* en el genoma mediante los citados métodos.

En un paso adicional, este plásmido sensible a la temperatura se sustituye por el plásmido de producción, que también contiene una copia funcional del gen *pyrH*. Esto se efectúa preferentemente del modo ya descrito.

En la producción de proteínas recombinantes se diferencia entre una producción citoplasmática y secretoria. Mientras que en la producción citoplasmática la proteína objetivo se acumula en el citoplasma de la célula, en la producción secretoria la proteína objetivo se transloca en el periplasma, o bien en el medio de cultivo. En el ámbito de la invención es preferente la producción secretoria. En especial es preferente la producción secretoria de la proteína objetivo en el medio de cultivo.

Para la producción secretoria de proteínas, es decir, para la translocación de la proteína del citoplasma en el periplasma, o bien el medio de cultivo, es necesario enlazar el extremo 5' del gen de la proteína a producir *en el marco* con el extremo 3' de una secuencia de señal para la exportación de proteína. A tal efecto, en principio son apropiados los genes de todas las secuencias de señal que conducen a una translocación de la proteína objetivo en el periplasma en *E. coli*. En *E. coli* son conocidas tres vías de translocación principales: la vía SEC, TAT y SRP. Son preferentes aquellas secuencias de señal que posibilitan una translocación a través del aparato SEC. En el estado de la técnica se describen diferentes secuencias de señal de tal naturaleza, por ejemplo, las secuencias de señal de los siguientes genes: *phoA*, *ompA*, *pelB*, *ompF*, *ompT*, *lamB*, *malE*, *dsbA*, proteína A de estafilococo, StII y otros (Choi and Lee, Appl. Microbiol. Biotechnol. 64 (2004), 625-635). Según la invención es preferente la secuencia de señal del gen *phoA* o del gen *ompA* de *E. coli* o la señal de secuencia para una ciclodextrina-glicosiltransferasa (CGTasa) de *Klebsiella pneumoniae* M5a1, o la secuencia derivada de esta secuencia de señal, que se da a conocer en el documento US2008076157.

El cultivo (la fermentación) de células que contienen un plásmido de producción se efectúa según procedimientos de fermentación habituales conocidos por el especialista en un biorreactor (fermentador) sin adición de antibióticos.

5 La invención se refiere también a un procedimiento para la producción de sustancias de bajo peso molecular o proteínas recombinantes por medio de una cepa de microorganismos, que está caracterizado por que se emplea una cepa de microorganismos según la invención y un medio de fermentación exento de antibiótico.

La fermentación tiene lugar en un biorreactor habitual, a modo de ejemplo un fermentador de columna de burbujas o un fermentador de levantamiento por aire. Es preferente un fermentador de caldera de agitación a escala técnica y, por lo tanto, con un tamaño de > 100 l.

10 En la fermentación se cultivan las células de la cepa según la invención en un medio líquido, controlándose de manera continua y dirigiéndose exactamente diferentes parámetros, como por ejemplo la alimentación de nutrientes, la presión parcial de oxígeno, el valor de pH y la temperatura de cultivo. El intervalo de tiempo de cultivo asciende preferentemente a 16-150 h, de modo especialmente preferente 24-72 h.

15 Como medios de fermentación entran en consideración todos los medios comunes conocidos por el especialista para el cultivo de microorganismos. No obstante, estos medios de fermentación están exentos de un antibiótico.

Se pueden emplear medios complejos o medios salinos mínimos, a los que se añade una proporción definida de componentes complejos, como por ejemplo peptona, triptona, extracto de levadura, melaza o Corn Steep Liquor. Preferentemente se emplea un medio con componentes de medio complejos.

20 Como fuente de carbono primaria para la fermentación se pueden emplear todos los azúcares, alcoholes sacáricos o ácidos orgánicos, o bien sus sales, utilizables por las células. En este caso se emplean preferentemente glucosa, lactosa o glicerina. Son especialmente preferentes glucosa y lactosa. También es posible una alimentación combinada de varias fuentes de carbono diferentes. En este caso, la fuente de carbono se puede disponer completamente en el medio de fermentación al comienzo de la fermentación o no se dispone nada o solo se dispone una parte de la fuente de carbono al comienzo, y se alimenta la fuente de carbono durante el transcurso de la fermentación. En este caso es especialmente preferente una forma de realización en la que se dispone una parte de la fuente de carbono y se alimenta una parte. De modo especialmente preferente, la fuente de carbono se dispone en una concentración de 10-30 g/l, se inicia la alimentación cuando la concentración ha descendido a menos de 5 g/l, y de este modo se configura que la concentración se mantenga por debajo de 5 g/l.

30 La presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) en el cultivo se sitúa preferentemente entre 10 y 70 % de saturación. Es preferente una  $pO_2$  entre 20 y 60 %, de modo especialmente preferente, la  $pO_2$  se sitúa entre 45 y 55 % de saturación.

El valor de pH del cultivo se sitúa preferentemente entre pH 6 y pH 8. Es preferente un valor de pH entre 6,5 y 7,5, de modo especialmente preferente, el valor de pH del cultivo se sitúa entre 6,8 y 7,2.

35 La temperatura del cultivo se sitúa entre 15 y 45°C. Es preferente un intervalo de temperaturas entre 18 y 40°C, es especialmente preferente un intervalo de temperaturas entre 25 y 35°C, son muy especialmente preferentes 30°C.

40 En un enfoque preferente, en el caso de la fermentación se trata de una fermentación de alta densidad celular. Se debe entender por una fermentación de alta densidad celular una fermentación en cuyo transcurso se alcanzan pesos anhidros celulares de más de 50 g/l. Son especialmente preferentes pesos anhidros celulares de más de 70 g/l.

La Fig. 1 muestra un mapa de restricción y función del plásmido pKD46 del Ej. 2.

La Fig. 2 muestra un mapa de restricción y función del plásmido pAF-ts-pyrH producido en el Ej. 2.

La Fig. 3 muestra un mapa de restricción y función del plásmido pAF-ts-plsC producido en el Ej. 2.

La Fig. 4 muestra un mapa de restricción y función del plásmido pMT1 empleado en el Ej. 5.

45 La Fig. 5 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR producido en el Ej. 5.

La Fig. 6 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pCGT\_tetR producido en el Ej. 6.

La Fig. 7 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pFab-anti-lisozima\_tetR producido en el Ej. 7.

50 La Fig. 8 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH1\_tetR producido en el Ej. 8.

La Fig. 9 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pCGT\_pyrH1\_tetR producido en el Ej. 8.

La Fig. 10 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pFab-anti-lisozima\_pyrH1\_tetR producido en el Ej. 8.

5 La Fig. 11 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC1\_tetR producido en el Ej. 8.

La Fig. 12 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pCGT\_plsC1\_tetR producido en el Ej. 8.

10 La Fig. 13 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de expresión pFab-anti-lisozima\_plsC1\_tetR producido en el Ej. 8.

La Fig. 14 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de producción según la invención pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH producido en el Ej. 9.

La Fig. 15 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de producción según la invención pCGT\_pyrH producido en el Ej. 9.

15 La Fig. 16 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de producción según la invención pFab-anti-lisozima\_pyrH producido en el Ej. 9.

La Fig. 17 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de producción según la invención pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC producido en el Ej. 9.

20 La Fig. 18 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de producción según la invención pCGT\_plsC producido en el Ej. 9.

La Fig. 19 muestra un mapa de restricción y función del plásmido de producción según la invención pFab-anti-lisozima\_plsC producido en el Ej. 9.

25 Los siguientes ejemplos sirven para la explicación ulterior de la invención. Todos los procedimientos de biología molecular y microbiológicos empleados, como reacción en cadena de polimerasa (PCR), síntesis génica, aislamiento y purificación de ADN, modificación de ADN mediante enzimas de restricción, fragmento de Klenow y ligasa, transformación, transducción P1, etc., se realizaron del modo conocido por el especialista, descrito en la literatura o recomendado por los respectivos fabricantes. Los siguientes ejemplos, siempre que se refieran al gen plsC, no corresponden a la invención y sirven solo para la ilustración.

### 30 **Ejemplo 1: amplificación del gen marcador (*pyrH*- o *plsC*) con promotor propio**

Se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb de tamaño, que codifica para el gen *pyrH* inclusive región de promotor nativa, con los cebadores pyrH-NcoI-fw (SEQ ID nº. 5) y pyrH-NcoI-rev (SEQ ID nº. 6). Como matriz para la reacción PCR sirvió ADN cromosómico de la cepa *E. coli* W3110 (ATCC 27325).

35 El fragmento de PRC de aproximadamente 1,0 kb de tamaño se purificó a través de una electroforesis en gel de agarosa y se aisló con el "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen GmbH, Hilden, D) según indicaciones del fabricante a partir del gel de agarosa. A continuación, se digirió y se almacenó a -20°C el fragmento de PCR purificado. Análogamente se codificó, se purificó, se digirió y se almacenó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb de tamaño, que codifica para el gen *plsC* inclusive región de promotor nativa. Para la amplificación se emplearon los cebadores plsC-NcoI-fw (SEQ ID nº. 7) y plsC-NcoI-rev (SEQ ID nº. 8).

### 40 **Ejemplo 2: generación de los plásmidos pAF-ts-pyrH y pAF-ts-plsC con origen de replicación sensible a la temperatura**

45 Como plásmido de partida para la construcción de los plásmidos pAF-ts-pyrH y pAF-ts-plsC con origen de replicación sensible a la temperatura se empleó el plásmido pKD46 (Datsenko und Wanner, 2000, P.N.A.S. 97: 6640-6645). En la Fig 1. se muestra un mapa de restricción y función del plásmido pKD46. En el punto de corte NcoI de pKD46 se clonaron los productos de PCR descritos en el Ejemplo 1 y digeridos con NcoI, que codifican para el gen *pyrH* o el gen *plsC* con promotor propio. Las preparaciones de ligación se transformaron en "células de *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1R" (Life Technologies GmbH), se multiplicaron en estas células y se verificó la secuencia de ADN de los plásmidos aislados por medio de secuenciación. Dos del total de los 4 posibles constructos que se generaron de este modo llevan las denominaciones pAF-ts-pyrH y pAF-ts-plsC (véase la Fig. 2 y 3).

### 50 **Ejemplo 3: transformación de cepas de *E. coli* seleccionadas con pAF-ts-pyrH o pAF-ts-plsC**

55 Los plásmidos pAF-ts-pyrH y pAF-ts-plsC con origen de replicación sensible a la temperatura descritos en el Ejemplo 2 se transformaron en ambas cepas de *E. coli* W3110 (ATCC 27325) y W3110pp3 (descritas en el documento US2008076158 A1 como cepa "permeable") con el método de CaCl<sub>2</sub> conocido por el especialista. La selección de las células transformadas se efectuó en placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina. Las cepas generadas de este modo llevan las denominaciones W3110/pAF-ts-pyrH, W3110pp3/pAF-ts-pyrH, W3110/pAF-ts-plsC y W3110pp3/pAF-ts-plsC.

**Ejemplo 4: delección del gen *pyrH* (desactivación de uridilatoquinasa), o bien del gen *plsC* (desactivación de 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa) en *E. coli*****A) Delección del gen *pyrH***

5 El gen *pyrH*, que codifica en *E. coli* para la enzima uridilatoquinasa (PyrH), se eliminó según el “método  $\lambda$ -Red” desarrollado por Datsenko y Wanner en las cepas de *E. coli* W3110/pAF-ts-*pyrH* y W31101pp3/pAF-ts-*pyrH* (Datsenko y Wanner, 2000, P.N.A.S. 97: 6640-6645). Se amplificó un fragmento de ADN, que codifica para el gen marcador de resistencia a kanamicina (*kanR*) con los cebadores *pyrH*-fw (SEQ ID nº. 9) y *pyrH*-rev (SEQ ID nº. 10). El cebador *pyrH*-fw codifica para una secuencia constituida por 30 nucleótidos, que es homóloga al extremo 5' del gen *pyrH*, y una secuencia que comprende 20 nucleótidos, que es complementaria a una secuencia de ADN que codifica uno de ambos sitios FRT (objetivo de reconocimiento FLP) en el plásmido pKD13 (Coli Genetic Stock Center (CGSC) nº 7633). El cebador *pyrH*-rev codifica para una secuencia constituida por 30 nucleótidos, que es homóloga al extremo 3' del gen *pyrH*, y una secuencia que comprende 20 nucleótidos, que es complementaria a una secuencia de ADN, que codifica el segundo sitio FRT en el plásmido pKD13.

15 El producto de PCR amplificado se introdujo en las cepas de *E. coli* W3110/pAFts-*pyrH* y W31101pp3/pAF-ts-*pyrH* (véase Ejemplo 3) por medio de electroporación. La selección en células con integración cromosómica del gen marcador de resistencia a kanamicina (*kanR*) se efectuó en placas de agar LB, que contenían 50 mg/l de kanamicina y 100 mg/l de ampicilina. La eliminación del gen marcador de resistencia a kanamicina introducido por vía cromosómica (*kanR*) se efectuó con la enzima *FLP*-recombinasa, que está codificada en el plásmido pCP20 (CGSC nº 7629). La selección en células que contenían pCP20 se efectuó en placas de agar LB que contenían 20 100 mg/l de ampicilina (selección en pAF-ts-*pyrH*) y 34 mg/l de cloranfenicol (selección en pCP20). Debido a un origen de replicación sensible a la temperatura (*ori*), el plásmido pCP20 se puede eliminar de nuevo una vez efectuada la transformación mediante cultivo de células de *E. coli* a temperatura no permisiva, es decir, elevada, por ejemplo, a 42°C.

25 Una primera selección sobre pérdida del plásmido pCP20 sensible a la temperatura en el caso de obtención simultánea del plásmido pAF-ts-*pyrH* sensible a la temperatura se efectuó en placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina (selección sobre pAF-ts-*pyrH*). En el transcurso ulterior se examinaron los clones bacterianos resistentes a ampicilina seleccionados previamente sobre sensibilidad a kanamicina, es decir, la pérdida del gen marcador de kanamicina introducido por vía cromosómica, así como sobre sensibilidad a cloranfenicol, es decir, la pérdida del plásmido pCP20 sensible a la temperatura.

30 Solo clones sensibles a kanamicina, así como cloranfenicol, pero resistentes a ampicilina, se examinaron finalmente con los cebadores *pyrH*-check-for (SEQ ID nº. 11) y *pyrH*-check-rev (SEQ ID nº. 12) sobre la delección cromosómica del gen *pyrH*. Como modelo para el examen de la delección de *pyrH* cromosómica por medio de PCR sirvió ADN cromosómico de los clones resistentes a ampicilina, sensibles a cloranfenicol y kanamicina seleccionados.

35 Las cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina generadas y examinadas de este modo, con delección de *pyrH* cromosómica y expresión de *pyrH* codificada por plásmido, llevan las denominaciones W3110 $\Delta$ *pyrH*/pAF-ts-*pyrH* y W31101pp3 $\Delta$ *pyrH*/pAF-ts-*pyrH*.

**B) Delección del gen *plsC***

40 Análogamente al gen *pyrH* se eliminó el gen *plsC*, que codifica en *E. coli* para la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato-O-aciltransferasa (PlsC), en las cepas de *E. coli* W3110/pAF-ts-*plsC* y W31101pp3/pAF-ts-*plsC* (Datsenko y Wanner, 2000, P.N.A.S. 97: 6640-6645). Se amplificó un fragmento de ADN, que codifica para el gen marcador de resistencia a kanamicina (*kanR*), con los cebadores *plsC*-fw (SEQ ID nº. 13) y *plsC*-rev (SEQ ID nº. 14). El cebador *plsC*-fw codifica para una secuencia constituida por 30 nucleótidos que es homóloga al extremo 5' del gen *plsC* y una secuencia que comprende 20 nucleótidos, que es complementaria a una secuencia de ADN, que codifica uno de 45 ambos sitios FRT (objetivo de reconocimiento FLP) en el plásmido pKD13 (Coli Genetic Stock Center (CGSC) nº 7633). El cebador *plsC* codifica para una secuencia constituida por 30 nucleótidos, que es homóloga al extremo 3' del gen *plsC*, y una secuencia que comprende 20 nucleótidos, que es complementaria a una secuencia de ADN, que codifica el segundo sitio FRT en el plásmido pKD13.

50 El producto de PCR amplificado se introdujo en las cepas de *E. coli* W3110/pAFts-*plsC* y W31101pp3/pAF-ts-*plsC* (véase Ejemplo 3) por medio de electroporación. La eliminación del gen marcador de resistencia a kanamicina introducido por vía cromosómica (*kanR*) se efectuó de nuevo con la enzima *FLP*-recombinasa (codificada en el plásmido pCP20). También en este caso, la selección de las células contenidas en pCP20 se efectuó en placas de agar LB que contenían 100 mg/l de ampicilina (selección en pAF-ts-*plsC*) y 34 mg/l de cloranfenicol (selección en pCP20). Una primera selección sobre pérdida del plásmido pCP20 sensible a la temperatura, con obtención 55 simultánea del plásmido pAF-ts-*plsC* sensible a la temperatura, se efectuó en placas de agar LB que contenían 100

mg/l de ampicilina (selección en pAF-ts-plsC). En el transcurso ulterior se examinaron los clones bacterianos resistentes a ampicilina seleccionados previamente sobre sensibilidad a kanamicina, es decir, la pérdida del gen marcador de kanamicina introducido por vía cromosómica, así como sobre sensibilidad a cloranfenicol, es decir, la pérdida del plásmido pCP20 sensible a la temperatura. Estos clones se examinaron finalmente con los cebadores plsC-check-for (SEQ ID nº. 15) y plsC-check-rev (SEQ ID nº. 16) sobre la delección cromosómica del gen *plsC*. Como modelo para el examen de la delección de *plsC* cromosómica por medio de PCR sirvió ADN cromosómico de los clones resistentes a ampicilina, sensibles a cloranfenicol y kanamicina seleccionados.

Las cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina generadas y examinadas de este modo, con delección de *plsC* cromosómica y expresión de *plsC* codificada por plásmido, llevan las denominaciones W3110ΔplsC/pAF-ts-plsC y W3110lpp3ΔplsC/pAF-ts-plsC.

#### **Ejemplo 5: generación de un plásmido de producción con gen de resistencia a antibióticos para la producción de cisteína**

Como plásmidos de partida para la clonación y expresión de los genes *cysEX* (codifica para la variante resistente a retroalimentación de serina aciltransferasa; CysE) y *orf306* (codifica para O-acetilserina / exportador de cisteína; EamA) sirvieron el plásmido base pMT1, así como el plásmido de producción pACYC184-LH-cysEX-orf306 descrito en el documento EP0885962B1.

Además del gen de resistencia a tetraciclina (*tetR*), pMT1 contiene aún el promotor *tac*, que se reprime mediante el producto génico *LacIq*, cuyo gen se presenta igualmente en el plásmido, y se puede activar mediante un inductor, como por ejemplo D-lactosa o isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

En la Fig. 4 se muestra un mapa de restricción y función del plásmido pMT1. La secuencia del plásmido pMT1 se deposita en el protocolo de secuencia (SEQ ID nº. 17).

Para la generación de un nuevo plásmido de producción para la producción de cisteína a base de pMT1 se ligó un fragmento NcoI-BsaBI del plásmido pACYC184-LH-cysEX-orf306 (descrito en el documento EP0885962 B1), que codifica para los genes *cysEX* y *orf306*, con un fragmento NcoI-PvuII de 2458 bp de tamaño (codifica para ColE1-ori y resistencia a tetraciclina, *tetR*) del plásmido pMT1.

La preparación de ligación se transformó en "células de *E. coli* DH5α™-T1R" (Life Technologies GmbH), se multiplicó en estas células, y la secuencia de ADN de los plásmidos aislados se verificó por medio de secuenciación. El plásmido de expresión resultante lleva la denominación pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR (véase la Fig. 5).

#### **Ejemplo 6: generación de un plásmido de producción con gen de resistencia a antibióticos para la producción de α-CGTase**

Como plásmidos de partida para la clonación y la expresión del gen de ciclodextrina-glicosil-transferasa (CGTasa) de *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (nº de banco génico M15264) sirvieron de nuevo el plásmido pMT1, así como el plásmido pCGT descrito en el documento US2008076158 A1. Para la generación de un nuevo plásmido de producción para la producción de CGTasa a base de pMT1 se ligó un fragmento MauBI-BsaI del plásmido pCGT, que codifica para el gen CGTase de *Klebsiella pneumoniae* M5a1, con un fragmento MauBI-BsaI de 4004 bp de tamaño del plásmido pMT1. Este fragmento del plásmido pMT1 de 4004 bp de tamaño codifica para el ColE1-ori, el operador *lac/tac* y el gen de resistencia a tetraciclina (*tetR*).

La preparación de ligación se transformó en "células de *E. coli* DH5α™-T1R" (Life Technologies GmbH), se multiplicó en estas células, y la secuencia de ADN de los plásmidos aislados se verificó por medio de secuenciación. El plásmido de expresión resultante lleva la denominación pCGT\_tetR (véase la Fig. 6).

#### **Ejemplo 7: generación de un plásmido de producción con gen de resistencia a antibióticos para la producción de Fab-anti-lisozima**

Como plásmidos de partida para la clonación y la expresión de los genes del fragmento anti-lisozima-Fab sirvieron de nuevo el plásmido pMT1, así como el pFab-anti-lisozima descrito en el documento US20080076158 A1. Para la generación de un nuevo plásmido de producción para la producción del fragmento de anticuerpo Fab-anti-lisozima a base de pMT1 se ligó un fragmento MauBI-BsaI del plásmido Fab-anti-lisozima, que codifica para ambas cadenas, es decir, la cadena pesada (dominios V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1) y la cadena ligera (dominios V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>) del fragmento anti-lisozima-Fab, con un fragmento MauBI-BsaI del plásmido pMT1 de 4004 bp de tamaño. Este fragmento del plásmido pMT1 de 4004 bp de tamaño codifica para el ColE1-ori, el operador *lac/tac* y el gen de resistencia a tetraciclina (*tetR*).

La preparación de ligación se transformó en "células de *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1R" (Life Technologies GmbH), se multiplicó en estas células, y la secuencia de ADN de los plásmidos aislados se verificó por medio de secuenciación. El plásmido de expresión resultante lleva la denominación pFab-anti-lisozima\_tetR (véase la Fig. 7).

5 **Ejemplo 8: generación de plásmidos de producción con los genes marcadores *pyrH* o *plsC* como base para la elaboración de plásmidos de producción según la invención sin gen de resistencia a antibióticos**

Como plásmidos de partida para la generación de plásmidos de producción con *pyrH* o *plsC* como gen marcador sirvieron los plásmidos pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR, pCGT\_tetR y pFab-anti-lisozima\_tetR descritos en los Ejemplos 5 a 7. Todos estos plásmidos poseen un único punto de corte de restricción NcoI (véase Figuras 5 a 7). Este punto de corte NcoI universal se utilizó para la clonación, o bien la integración de los genes *pyrH* o *plsC*.

10 A tal efecto, los productos de PCR descritos en el Ejemplo 1 y cortados con la enzima de restricción NcoI se ligaron con los plásmidos pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR, pCGT\_tetR y pFab-anti-lisozima\_tetR, después de cortar estos asimismo con NcoI. Las preparaciones de ligación individuales se transformaron en "células de *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1R" (Life Technologies GmbH), se multiplicaron en estas células y se verificó la secuencia de ADN de los plásmidos aislados por medio de secuenciación. Los constructos resultantes, según orientación del gen marcador empleado,  
15 llevan las siguientes denominaciones:

- pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH1\_tetR (véase la Fig. 8) y pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH2\_tetR
- pCGT\_pyrH1\_tetR (véase la Fig. 9) y pCGT\_pyrH2\_tetR
- pFab-anti-lisozima\_pyrH1\_tetR (véase la Fig. 10) y pFab-anti-lisozima\_pyrH2\_tetR
- pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC1\_tetR (véase la Fig. 11) und pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC2\_tetR
- 20 • pCGT\_plsC1\_tetR (véase la Fig. 12) y pCGT\_plsC2\_tetR
- pFab-anti-lisozima\_plsC1\_tetR (véase la Fig. 13) y pFab-anti-lisozima\_plsC2\_tetR

Para la eliminación final del gen tetR se trabajó ulteriormente con las variantes pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH1\_tetR, pCGT\_pyrH1\_tetR, pFab-anti-lisozima\_pyrH1\_tetR, pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC1\_tetR, pCGT\_plsC1\_tetR y pFab-anti-lisozima\_plsC1\_tetR (véase la Fig. 8 a 13).

25 **Ejemplo 9: eliminación del gen de resistencia a antibióticos tetR y transformación de los plásmidos de producción con *pyrH*, o bien *plsC*, como gen marcador remanente en cepas de *E. coli* con delección cromosómica de *pyrH*, o bien *plsC***

Como plásmidos de partida para la generación de plásmidos de producción sin el gen de resistencia a antibióticos tetR y con *pyrH* o *plsC* como gen marcador sirvieron los plásmidos pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH1\_tetR, pCGT\_pyrH1\_tetR, pFab-anti-lisozima\_pyrH1\_tetR, pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC1\_tetR, pCGT\_plsC1\_tetR y pFab-anti-lisozima\_plsC1\_tetR descritos en el Ejemplo 8. La eliminación del gen de resistencia a antibióticos tetR de los plásmidos pFab-anti-lisozima\_pyrH1\_tetR y pFab-anti-lisozima\_plsC1\_tetR descritos en el Ejemplo 8 se efectuó a través de una digestión con la enzima de restricción ClaI y subsiguiente religación.

35 Para los plásmidos pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH1\_tetR, o bien pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC1\_tetR, se procedió análogamente, excepto que el gen *tetR* se eliminó a través de una digestión parcial con ClaI, ya que en los genes estructurales *cysEX* y *orf306* se encuentran otros dos puntos de corte ClaI (véase la Fig. 8 y 11).

En el caso de pCGT\_plsC1\_tetR, el gen *tetR* se eliminó a través de una digestión con las enzimas StuI (corta el extremo blunt) y FspI (corta el extremo blunt) del plásmido.

40 En el caso de pCGT\_pyrH1\_tetR, el gen *tetR* se eliminó asimismo a través de una digestión parcial con las enzimas StuI (corta el extremo blunt) y FspI (corta el extremo blunt), ya que en el gen *pyrH* se encuentra otro punto de corte FspI (véase la Fig. 9).

Los respectivos fragmentos de vector lineales sin *tetR* se purificaron tras la digestión con enzimas de restricción a través de una electroforesis en gel de agarosa y se aislaron con el "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen GmbH, Hilden, D) según datos del fabricante a partir del gel de agarosa. A continuación se religó el respectivo fragmento de vector exento de *tetR*.

45 Las correspondientes preparaciones de ligación se transformaron con un método de CaCl<sub>2</sub> modificado en las cepas W3110 $\Delta$ pyrH/pAF-ts-pyrH, o bien W3110lpp3 $\Delta$ pyrH/pAF-ts-pyrH o W3110 $\Delta$ pyrH/pAF-ts-plsC, o bien W3110lpp3 $\Delta$ pyrH/pAF-ts-plsC, descritas en el Ejemplo 4. Para la transformación, es decir, la introducción de los plásmidos de producción exentos de resistencia a antibióticos con *pyrH* o *plsC* como gen marcador en cepas de  
50 *E. coli* con correspondiente delección cromosómica (*pyrH* o *plsC*) se procedió de la siguiente manera:

5 tras la adición de 5 a 20  $\mu$ l de la respectiva preparación de ligación a 100  $\mu$ l de células competentes con  $\text{CaCl}_2$  de las cepas W3110 $\Delta$ pyrH/pAF-ts-pyrH y W3110lpp3 $\Delta$ pyrH/pAF-ts-pyrH, o bien W3110 $\Delta$ plsC/pAF-ts-plsC y W3110lpp3 $\Delta$ plsC/pAF-ts-plsC, se incubaron las células en hielo durante 30 minutos más. Tras un choque térmico breve durante 45 segundos a 42°C se enfriaron las células 2 min en hielo. A continuación se añadieron 900  $\mu$ l de medio LB a la preparación de transformación y se incubaron/regeneraron las células no como es habitual a 37°C, sino 30 a 90 min a 47°C hasta 55°C. La incubación ulterior a temperatura elevada no permisiva se efectuó entonces durante 15 a 24 h a 40-45°C sobre placas de agar LB o en medio LB líquido sin antibiótico (por ejemplo sin tetraciclina).

10 La fase de regeneración de 30 – 90 minutos a 47°C hasta 55°C, así como el cultivo durante 15 a 24 h a temperatura elevada, no permisiva, facilita la sustitución de plásmidos sensibles a la temperatura pAF-ts-pyrH, o bien pAF-ts-plsC, por el plásmido de producción final, exento de resistencia a antibióticos, con *pyrH* o *plsC* como nuevo gen marcador de selección.

15 Se obtuvieron los mejores resultados de transformación si las células transformadas se regeneraron 60 min a 52°C y a continuación se incubaron 20 h a 42°C en placas de agar LB. Una selección previa sobre pérdida del plásmido sensible a la temperatura pAF-ts-pyrH, o bien pAF-ts-plsC, con sustitución simultánea por el respectivo plásmido de producción que contiene *pyrH* o *plsC* sin gen de resistencia a tetraciclina *tetR*, se efectuó en primer lugar en placas de agar LB sin antibiótico.

A continuación se examinaron los clones bacterianos seleccionados previamente sobre sensibilidad a ampicilina, es decir, la pérdida del plásmido sensible a la temperatura pAF-ts-pyrH, o bien pAF-ts-plsC.

20 Los plásmidos de producción de clones sensibles a ampicilina que codifican *pyrH* o *plsC* se examinaron finalmente por medio de digestión con enzimas de restricción. En las Figuras 14 a 16 se representan mapas de restricción de los plásmidos de producción que codifican *pyrH* pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH, pCGT\_pyrH y pFab-anti-lisozima\_pyrH, respectivamente sin el gen de resistencia a antibióticos *tetR*. En las Figuras 17 a 19 se representan mapas de restricción de los plásmidos de producción que codifican *plsC* pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC, pCGT\_plsC y pFab-anti-lisozima\_plsC, respectivamente sin el gen de resistencia a antibióticos *tetR*.

25 Las cepas de *E. coli* exentas de resistencia a antibióticos generadas y examinadas de este modo, con plásmido de producción que codifica *pyrH* o *plsC* y delección cromosómica de *pyrH*, o bien *plsC*, llevan las denominaciones:

- W3110 $\Delta$ pyrH/pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH
- W3110lpp3 $\Delta$ pyrH/pCGT\_pyrH
- W3110lpp3 $\Delta$ pyrH/pFab-anti-lisozima\_pyrH
- 30 • W3110 $\Delta$ plsC/pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC
- W3110lpp3 $\Delta$ plsC/pCGT\_plsC
- W3110lpp3 $\Delta$ plsC/pFab-anti-lisozima\_plsC

### Ejemplo 10: fermentación de cisteína

#### Cultivo previo 1:

35 Se inocularon 20 ml de medio LB en matraz Erlenmeyer (100 ml) con la respectiva cepa de *E. coli* W3110/pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR, W3110 $\Delta$ pyrH/pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH o W3110 $\Delta$ plsC/pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC y se incubaron durante siete horas en un agitador (150 rpm, 30°C). Para un cultivo de constructo W3110/pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR en el sentido del estado de la técnica, es decir, con antibiótico como agente de selección, se suplementó el medio con 15 mg/L de tetraciclina.

#### 40 Cultivo previo 2:

45 A continuación se trasladó el cultivo previo 1 completamente a 100 ml de medio SM1 (12 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,3 g/l de  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,015 g/l de  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,002 g/l de  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g/l de  $\text{Na}_3$  citrato  $\times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/l de NaCl, 1 ml/l de disolución de oligoelementos, constituida por 0,15 g/l de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g/l de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,7 g/l de  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/l de  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g/l de  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g/l de  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ), que estaba suplementada con 5 g/l de glucosa y 5 mg/l de vitamina B1. Los cultivos se agitaron en matraz Erlenmeyer (1 l) a 30 °C durante 17 h con 150 rpm. Tras esta incubación, la densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) se situaba entre 3 y 5. Para el cultivo de W3110/pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR en el sentido del estado de la técnica, es decir, con antibiótico como medio de selección, se suplementó el medio con 15 mg/L de tetraciclina.

**Cultivo principal:**

La fermentación se realizó en fermentadores de tipo BIOSTAT B de la firma Sartorius Stedim. Se empleó un recipiente de cultivo con 2 l de volumen total. El medio de fermentación (900 ml) contiene 15 g/l de glucosa, 10 g/l de triptona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 5 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de NaCl, 0,3 g/l de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,015 g/l de CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,075 g/l de FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1 g/l de Na<sub>3</sub> citrato x 2 H<sub>2</sub>O y 1 ml de disolución de oligoelementos (véase anteriormente) y 0,005 g/l de vitamina B1. El valor de pH en el fermentador se ajustó a 6,5 al comienzo mediante bombeo de una disolución al 25 % de NH<sub>4</sub>OH. Durante la fermentación se mantuvo el valor de pH a un valor de 6,5 mediante corrección automática con NH<sub>4</sub>OH al 25 %. Para la inoculación se bombearon 100 ml de cultivo previo 2 al recipiente del fermentador. Por consiguiente, el volumen inicial ascendía aproximadamente a 1 l. Los cultivos se agitaron al comienzo con 400 rpm y se gasificaron con 2 vvm de un aire a presión purificado a través de un filtro estéril. Bajo estas condiciones iniciales, la sonda de oxígeno se había calibrado a 100 % de saturación antes de la inoculación. El valor teórico para la saturación de O<sub>2</sub> durante la fermentación se ajustó a 50 %. Tras reducción de la saturación de O<sub>2</sub> por debajo del valor teórico se inició una cascada de regulación para aproximar de nuevo la saturación de O<sub>2</sub> al valor teórico. En este caso, en primer lugar se aumentó continuamente la alimentación de gas (a un máximo de 5 vvm), y a continuación se incrementó continuamente la velocidad de agitación (a un máximo de 1.500 rpm).

La fermentación se realizó a una temperatura de 30°C. Después de 2 h de tiempo de fermentación se efectuó la alimentación de una fuente de azufre en forma de una disolución madre estéril de tiosulfato sódico x 5 H<sub>2</sub>O al 60 % con una tasa de 1,5 ml por hora. Tan pronto como el contenido en glucosa en el fermentador había descendido de inicialmente 15 g/l a aproximadamente 2 g/l se efectuó una dosificación continua de una disolución de glucosa al 56 %. La tasa de alimentación se ajustó de modo que la concentración de glucosa en el fermentador ya no sobrepasaba 2 g/l en adelante.

La determinación de glucosa se realizó con un analizador de glucosa de la firma YSI (Yellow Springs, Ohio, USA). Para la fermentación del constructo W3110/pcysEX-GAPDH-ORF306\_tet<sup>R</sup> en el sentido del estado de la técnica, es decir, con antibiótico como medio de selección, se suplementó el medio con 15 mg/L de tetraciclina.

El tiempo de fermentación ascendía a 48 horas. A continuación se extrajeron muestras y se determinó el contenido de L-cisteína y los derivados obtenidos de la misma en el sobrenadante de cultivo (sobre todo L-cisteína y tiazolidina) y en el precipitado (L-cistina) por separado respectivamente. Con este fin se empleó respectivamente el test colorimétrico de Gaitonde (Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627-633). La L-cistina que se encontraba en el precipitado se tuvo que disolver en primer lugar en ácido clorhídrico al 8 % antes de poderse cuantificar del mismo modo. Los valores para cisteína total indicados en la Tabla 1 corresponden a la suma de L-cisteína en el sobrenadante de cultivo y L-cistina en el precipitado. En este caso, a cada molécula de L-cistina corresponden dos moléculas de L-cisteína.

**Tabla 1: contenido en cisteína total (L-cisteína<sub>sobrenadante de cultivo</sub> + L-cistina<sub>precipitado</sub>) en el caldo de cultivo después de 48 h y estabilidad de los plásmidos de producción**

±±Cepa	Cisteína total (g/L)	Estabilidad de plásmido
W3110/pcysEX-GAPDH-ORF306_tet <sup>R</sup> (cultivada con tetraciclina) *	19,0 ± 0,4	95% ± 5%
W3110/pcysEX-GAPDH-ORF306_tet <sup>R</sup> (cultivada sin tetraciclina)	10,0 ± 4,1	60% ± 19%
W3110ΔpyrH x pcysEX-GAPDH-ORF306_pyrH1**	20,4 ± 0,3	97% ± 3%
W3110ΔplsC/pcysEX-GAPDH-ORF306_plsC**	21,1 ± 0,3	95% ± 5%
<b>*Constructo en el sentido del estado de la técnica (Ejemplo comparativo)</b>		
<b>**Constructo según la invención</b>		

**Ejemplo 11: producción secretoria de una ciclodextrina-glicosil-transferasa a escala de 10 l (fermentación)**

Con ayuda de un mutante *lpp* de *E. coli* se pueden producir y secretar en el medio enzimas relevantes desde el punto de vista biotecnológico, como por ejemplo CGTasas (US2008076158 A1).

La producción secretoria de CGTasa se efectuó en fermentadores de caldera de agitación de 10 L con las cepas W3110lpp3/pCGT\_tet<sup>R</sup> (control), W3110lpp3ΔpyrH/pCGT\_pyrH y W3110lpp3ΔpyrH/pCGT\_plsC. El fermentador cargado con 6 l de medio de fermentación FM4 (1,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 g/l de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,15 g/l de CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,075 g/l de FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 1 g/l de Na<sub>3</sub> citrato x 2 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/l de NaCl; 1 ml/l de disolución de oligoelementos (0,15 g/l de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 2,5 g/l de Na<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,7 g/l de CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 0,25 g/l de CuSO<sub>4</sub> x 5

5 H<sub>2</sub>O; 1,6 g/l de MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 0,3 g/l de ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O); 5 mg/l de vitamina B<sub>1</sub>; 3 g/l de fitona; 1,5 g/l de extracto de levadura; 10 g/l de glucosa) se inoculó en proporción 1 : 10 con un cultivo previo, que se cultivó durante la noche en el mismo medio. Durante la fermentación se ajustó una temperatura de 30°C y se mantuvo constante el valor de pH a un valor de 7,0 mediante dosificación de NH<sub>4</sub>OH, o bien H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Se añadió glucosa durante la fermentación, pretendiéndose una concentración máxima de glucosa de < 10 g/l en el medio de fermentación. La inducción de la expresión se efectuó mediante adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta 0,1 mM al final de la fase de crecimiento logarítmica.

Para la fermentación del constructo W3110lpp3/pCGT\_tetR en el sentido del estado de la técnica, es decir, con antibiótico como medio de selección, se suplementó el medio con 15 mg/L de tetraciclina.

10 Después de 72 h de fermentación se extrajeron muestras, se separaron las células mediante centrifugado del medio de fermentación y se determinó el contenido en CGTasa en el sobrenadante de fermentación, como se describe en el Ejemplo 4 del documento US2008076158A1.

En la Tabla 2 se enumeran los rendimientos de CGTasas funcionales, así como las actividades en el sobrenadante de fermentación.

15 **Tabla 2: rendimientos de ciclodextrina-glicosiltransferasa en el sobrenadante de fermentación después de 72 horas de fermentación**

Cepa	CGTasa (U/ml)	CGTasa (mg/l)	Estabilidad de plásmido
W3110lpp3/pCGT_tetR (cultivada con tetraciclina)*	555 ± 15	3750 ± 145	97% ± 3%
W3110lpp3/pCGT_tetR (cultivada sin tetraciclina)	340 ± 65	2210 ± 425	55% ± 21%
W3110lpp3ΔpyrH/pCGT_pyrH**	560 ± 25	3795 ± 160	98% ± 2%
W3110lpp3ΔplsC/pCGT_plsC**	570 ± 30	3810 ± 190	98% ± 2%
<b>*Constructo en el sentido del estado de la técnica (Ejemplo comparativo)</b>			
<b>**Constructo según la invención</b>			

20 **Ejemplo 12: producción secretoria, fermentativa, del fragmento de anticuerpo Fab anti-lisozima-Fab a escala de 10 l**

Con ayuda de un mutante *lpp* de *E. coli* se pueden producir también extracelularmente fragmentos de anticuerpo Fab funcionales (US2008076158A1). En este caso, la célula debe sintetizar simultáneamente los correspondientes fragmentos de la cadena ligera que comprende los dominios V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>, y de la cadena pesada que comprende los dominios V<sub>H</sub> y CH<sub>1</sub>, y después secretar estos en el periplasma, y finalmente en el medio de fermentación. Fuera del citoplasma se efectúa entonces el ensamblaje de ambas cadenas para dar el fragmento Fab funcional.

25 El presente ejemplo describe la producción de un fragmento Fab del anticuerpo de antilisoizima D1.3 convenientemente caracterizado. Los plásmidos pFab-anti-lisoizima\_tetR, pFab-anti-lisoizima\_pyrH y pFab-anti-lisoizima\_plsC contienen, además de los genes marcadores *tetR*, *pyrH*, o bien *plsC*, entre otros también los genes estructurales para el HC y el LC del fragmento Fab en forma de un operón. En este caso, el HC *en el marco* está fusionado en el extremo 3' de la secuencia de señalización *ompA* (*ompA<sup>SS</sup>*) y el LC *en el marco* en el extremo 3' de una secuencia de señalización de CGTasa (*cgt<sup>SS</sup>*). La expresión del operón *ompA<sup>SS</sup>-HC-cgt<sup>SS</sup>-LC* está bajo el control del promotor *tac*.

30 La producción del fragmento anti-lisoizima a escala de 10 l se efectuó análogamente al procedimiento de CGTasa descrito en el Ejemplo 11 con las cepas W3110lpp3/pFab-anti-lisoizima\_tetR, W3110lpp3ΔpyrH/pFab-anti-lisoizima\_pyrH y W3110lpp3ΔplsC/pFab-anti-lisoizima\_plsC. Para la fermentación de W3110lpp3/pFab-anti-lisoizima\_tetR de *E. coli* en el sentido del estado de la técnica, es decir, con antibiótico como medio de selección, se suplementó el medio con 15 mg/L de tetraciclina.

Después de 72 h de fermentación se extrajeron muestras y a continuación se separaron las células mediante centrifugado del medio de fermentación.

40 La purificación del fragmento anti-lisoizima-Fab a partir de los sobrenadantes de fermentación se efectuó por medio de cromatografía de afinidad como se describe en Skerra (1994, Gene 141, 79-84).

La cuantificación, así como la determinación de la actividad del fragmento anti-lisoizima-Fab purificado se efectuó a través de un ensayo ELISA con lisoizima como antígeno (Skerra, 1994, Gene 141, 79-84).

En la Tabla 2 se enumeran los rendimientos extrapolados en fragmento anti-lisozima-Fab funcional en el sobrenadante de fermentación, basados en cantidades aisladas a partir de 20 ml de sobrenadante de fermentación respectivamente tras 72 h de fermentación.

5

**Tabla 3: rendimientos en fragmento anti-lisozima-Fab en el sobrenadante de fermentación tras 72 h de fermentación**

Cepa	Rendimiento en fragmento anti-lisozima-Fab [mg/l] en el sobrenadante de fermentación (extrapolado)	Estabilidad de plásmido
W3110lpp3/pFab-anti-lisozima_tetR (cultivado con tetraciclina)*	1440 ± 110	97% ± 3%
W3110lpp3/pFab-anti-lisozima_tetR (cultivado sin tetraciclina)	625 ± 250	55% ± 20%
W3110lpp3ΔpyrH/pFab-anti-lisozima_pyrH**	1580 ± 115	98% ± 2%
W3110lpp3ΔplsC/pFab-anti-lisozima_plsC**	1610 ± 130	98% ± 2%
<b>*Constructo en el sentido del estado de la técnica (Ejemplo comparativo)</b>		
<b>**Constructo según la invención</b>		

**Ejemplo 13: determinación de la estabilidad de plásmido**

10

La estabilidad de plásmido se examinó por medio de preparación de plásmido con subsiguiente digestión con enzimas de restricción. A tal efecto, una vez concluido el cultivo de las cepas de producción (por ejemplo después de 72 h de fermentación) se sembraron diferentes diluciones de cultivos sobre placas de agar LB. Para la subsiguiente determinación de la estabilidad de plásmido, es decir, la identificación de células que portan plásmido (colonias), se recurrió solo a placas LB con colonias individuales para la valoración.

15

En total se cultivaron 50 colonias individuales en medio LB líquido durante 15 a 20 horas y a continuación se aisló ADN plasmídico a partir de estos cultivos. Por medio de muestras de restricción características para los plásmidos de producción individuales se verificó la exactitud de los plásmidos aislados.

LISTA DE SECUENCIAS

20

<110> Consortium für elektrochemische Industrie - Wacker Chemie AG  
Bornhövd, Dr. Carsten  
Thön, Dr. Marcel

<120> Cepa de microorganismos y procedimiento para la producción fermentativa exenta de antibióticos de sustancias y proteínas de bajo peso molecular

<130> Co11517

25

<150> Co11517  
<151> 2015-08-27

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

30

<210> 1  
<211> 726  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli

35

<220>  
<221> genes  
<222> (1)..(726)  
<223> pyrH

ES 2 867 964 T3

<400> 1

atggctacca atgcaaaacc cgtctataaa cgcattctgc ttaagttgag tggcgaagct	60
ctgcagggca ctgaaggctt cggatttgat gcaagcatac tggatcgtat ggctcaggaa	120
atcaaagaac tggttgaact gggatttcag gttgggtgtgg tgattgggtgg gggtaacctg	180
ttccgtggcg ctggtctggc gaaagcgggt atgaaccgcg ttgtgggcga ccacatgggg	240
atgctggcga ccgtaatgaa cggcctggca atgcgtgatg cactgcaccg cgcctatgtg	300
aacgctcgtc tgatgtccgc tattccattg aatggcgtgt gcgacagcta cagctgggca	360
gaagctatca gcctggtgcg caacaaccgt gtggtgatcc tctccgcggt tacaggtaac	420
ccgttcttta ccaccgactc agcagcttgc ctgcgtggta tcgaaattga agccgatgtg	480
gtgctgaaag caaccaaagt tgacggcgtg tttaccgctg atccggcgaa agatccaacc	540
gcaaccatgt acgagcaact gacttacagc gaagtgctgg aaaaagagct gaaagtcatg	600
gacctggcgg ccttcacgct ggctcgtgac cataaattac cgattcgtgt tttcaatatg	660
aacaaaccgg gtgcgctgcg ccgtgtggta atgggtgaaa aagaaggac tttaatcacg	720
gaataa	726

<210> 2

<211> 241

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> PÉPTIDOS

<222> (1)..(241)

10 <400> 2

ES 2 867 964 T3

Met Ala Thr Asn Ala Lys Pro Val Tyr Lys Arg Ile Leu Leu Lys Leu  
 1 5 10 15

Ser Gly Glu Ala Leu Gln Gly Thr Glu Gly Phe Gly Ile Asp Ala Ser  
 20 25 30

Ile Leu Asp Arg Met Ala Gln Glu Ile Lys Glu Leu Val Glu Leu Gly  
 35 40 45

Ile Gln Val Gly Val Val Ile Gly Gly Gly Asn Leu Phe Arg Gly Ala  
 50 55 60

Gly Leu Ala Lys Ala Gly Met Asn Arg Val Val Gly Asp His Met Gly  
 65 70 75 80

Met Leu Ala Thr Val Met Asn Gly Leu Ala Met Arg Asp Ala Leu His  
 85 90 95

Arg Ala Tyr Val Asn Ala Arg Leu Met Ser Ala Ile Pro Leu Asn Gly  
 100 105 110

Val Cys Asp Ser Tyr Ser Trp Ala Glu Ala Ile Ser Leu Leu Arg Asn  
 115 120 125

Asn Arg Val Val Ile Leu Ser Ala Gly Thr Gly Asn Pro Phe Phe Thr  
 130 135 140

Thr Asp Ser Ala Ala Cys Leu Arg Gly Ile Glu Ile Glu Ala Asp Val  
 145 150 155 160

Val Leu Lys Ala Thr Lys Val Asp Gly Val Phe Thr Ala Asp Pro Ala  
 165 170 175

Lys Asp Pro Thr Ala Thr Met Tyr Glu Gln Leu Thr Tyr Ser Glu Val  
 180 185 190

Leu Glu Lys Glu Leu Lys Val Met Asp Leu Ala Ala Phe Thr Leu Ala

ES 2 867 964 T3

	195		200		205										
Arg	Asp	His	Lys	Leu	Pro	Ile	Arg	Val	Phe	Asn	Met	Asn	Lys	Pro	Gly
	210					215					220				
Ala	Leu	Arg	Arg	Val	Val	Met	Gly	Glu	Lys	Glu	Gly	Thr	Leu	Ile	Thr
225					230					235					240

Glu

5 <210> 3  
 <211> 738  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

10 <220>  
 <221> genes  
 <222> (1)..(738)  
 <223> plsC

<400> 3

```

atgctatata tctttcgtct tattattacc gtgatttaca gcatcttagt ctgtgtattc      60
ggctccattt actgcctttt cagcccgegt aaccggaaac atgtggccac ctttgggcat      120
atgtttggcc gtcttgccgc gctgtttggc ctgaaagttg agtgccgtaa acctacagac      180
gctgaaagct acggcaatgc tatctataac gctaaccacc agaacaacta tgacatggtg      240
acagcatcga acatcgtgca accgcccagc gtgacggtag gtaaaaagag cttgctgtgg      300
atccccttct tcgggcagtt gtactggtta accggcaact tattgatcga cagaaacaat      360
cgcactaaag ctcacggcac cattgcggaa gtagtgaatc acttcaaaaa acgccgtatt      420
tccatctgga tgttcccgga aggaaccgcg agccgtggtc gcggcctgct accgttcaag      480
actggagcat ttcacgcggc aattgcggcg ggcgtcccga ttattcccgt gtgcgtctct      540
acaacttcga ataagattaa tcttaatcga ctgcacaacg gtctggtgat tgtcgaaatg      600
ctgccgcaa ttgacgtcag tcagtatggc aaagatcagg ttcgtgagct ggctgcccac      660
tgtcgttcga taatggaaca aaaaatcgcc gagctcgata aagaagtcgc agaacgcgaa      720
gccgcccgaa aagtttaa                                     738
  
```

15 <210> 4  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

20 <220>  
 <221> PÉPTIDOS  
 <222> (1)..(245)

ES 2 867 964 T3

<220>  
 <221> PÉPTIDOS  
 <222> (1)..(245)  
 <223> PlsC

5 <400> 4

Met Leu Tyr Ile Phe Arg Leu Ile Ile Thr Val Ile Tyr Ser Ile Leu  
 1 5 10 15

Val Cys Val Phe Gly Ser Ile Tyr Cys Leu Phe Ser Pro Arg Asn Pro  
 20 25 30

Lys His Val Ala Thr Phe Gly His Met Phe Gly Arg Leu Ala Pro Leu  
 35 40 45

Phe Gly Leu Lys Val Glu Cys Arg Lys Pro Thr Asp Ala Glu Ser Tyr  
 50 55 60

Gly Asn Ala Ile Tyr Ile Ala Asn His Gln Asn Asn Tyr Asp Met Val  
 65 70 75 80

Thr Ala Ser Asn Ile Val Gln Pro Pro Thr Val Thr Val Gly Lys Lys  
 85 90 95

Ser Leu Leu Trp Ile Pro Phe Phe Gly Gln Leu Tyr Trp Leu Thr Gly  
 100 105 110

Asn Leu Leu Ile Asp Arg Asn Asn Arg Thr Lys Ala His Gly Thr Ile  
 115 120 125

Ala Glu Val Val Asn His Phe Lys Lys Arg Arg Ile Ser Ile Trp Met  
 130 135 140

Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Gly Arg Gly Leu Leu Pro Phe Lys  
 145 150 155 160

Thr Gly Ala Phe His Ala Ala Ile Ala Ala Gly Val Pro Ile Ile Pro  
 165 170 175

Val Cys Val Ser Thr Thr Ser Asn Lys Ile Asn Leu Asn Arg Leu His  
 180 185 190

Asn Gly Leu Val Ile Val Glu Met Leu Pro Pro Ile Asp Val Ser Gln

ES 2 867 964 T3

195

200

205

Tyr Gly Lys Asp Gln Val Arg Glu Leu Ala Ala His Cys Arg Ser Ile  
 210 215 220

Met Glu Gln Lys Ile Ala Glu Leu Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Glu  
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Lys Val  
 245

- 5 <210> 5  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético
- 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: pyrH-Ncol-fw
- <400> 5  
 ccccccattg ccatcttga aattcagcta accctgtgg 40
- 15 <210> 6  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: pyrH-Ncol-rev
- 20 <400> 6  
 ggggccatgg atcctcacgt actttgtac gctccggtg 40
- 25 <210> 7  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: plsC-Ncol-fw
- 30 <400> 7  
 ccccccattg attgctcca tgtaaaactg gctaaag 37
- <210> 8  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético
- 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: plsC-Ncol-rev

ES 2 867 964 T3

	<400> 8		
	ggggccatgg tgaaccggt gttattcat gcgtgcat		40
	<210> 9		
	<211> 71		
5	<212> ADN		
	<213> Oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<223> Oligonucleótido sintético: pyrH-fw		
10	<220>		
	<221> misc_feature		
	<223> Oligonucleótido: pyrH-fw		
	<400> 9		
	cagtcttaat tatcaaaaag gagccgctg agggcggtt ctttttgtgc cgtgtaggct		60
	ggagctgctt c		71
15			
	<210> 10		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Oligonucleótido sintético		
20	<220>		
	<221> misc_feature		
	<223> Oligonucleótido: pyrH-rev		
	<400> 10		
	gtaatcgtct ggattattag gctattttat ttgccatttt ggccccgggc atgggaatta		60
	gccatggtcc		70
25			
	<210> 11		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Oligonucleótido sintético		
30	<220>		
	<221> misc_feature		
	<223> Oligonucleótido: pyrH-check-for		
	<400> 11		
	gcataacgct gaagtgactg gttcatccg		30
35	<210> 12		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Oligonucleótido sintético		
	<220>		
40	<221> misc_feature		
	<223> Oligonucleótido: pyrH-check-rev		
	<400> 12		
	cagaccagac agtcacacac agtgaagtg		30

ES 2 867 964 T3

<210> 13  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: plsC-fw

<400> 13

ctgacgtcaa ttggcggcag catttcgaca atcaccagac cgttgtgcag cgtgtaggct 60

ggagctgctt c 71

10 <210> 14  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético

<220>

15 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: plsC-rev

<400> 14

ctgacgtcaa ttggcggcag catttcgaca atcaccagac cgttgtgcag cgtgtaggct 60

ggagctgctt c 71

20 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético

<220>

25 <221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: plsC-check-for

<400> 15  
 cgagattcaa gtagcggcgg aacgggtagc 30

30 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc\_feature  
 <223> Oligonucleótido: plsC-check-rev

35 <400> 16  
 gttaagtctg catccggcag cgtattcaac 30

<210> 17  
 <211> 4487  
 <212> ADN  
 <213> Plásmido

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4308)  
 <223> Plásmido pMT1

ES 2 867 964 T3

<400> 17

togtgtcgct caaggcgcac tcccgttctg gataatgttt tttgcgccga catcataacg	60
gttctggcaa atattctgaa atgagctggt gacaattaat catcggtctg tataatgtgt	120
ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagaa ttcccgggga tccgtcgacc	180
tgcagccaag cttggctggt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa	240
atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaaca gaatttgctt ggcggcagta gcgcggtggt	300
cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgccgatg gtagtgtggg	360
gtctcccat gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga	420
aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt tgtcggtgaa cgctctctctg agtaggacaa	480
atccgccggg agcggatttg aacgttgcca agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac	540
gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt	600
ttgcgtttct acaaactctt ttgtttatth ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc	660
atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt	720
cggtcgccgc atacactatt ctccagaatga cttgggtgag tccatggcgg ccgccgatct	780
aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc	840
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc	900
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg	960
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa	1020

ES 2 867 964 T3

atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcacgcg 1080  
 ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 1140  
 gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa 1200  
 cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 1260  
 tacagcgtga gcattgagaa agcgcacgcg ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 1320  
 cggtaagcgg cagggctcga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct 1380  
 ggtatcttta tagtcctgtc gggtttccgc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 1440  
 gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgattctca tgtttgacag cttatcatcg 1500  
 ataagctcca ggaccaacg ctgcccgaga tgcgccgcgt gcggctgctg gagatggcgg 1560  
 acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg tttgcgcatt cacagttctc cgcaagaatt 1620  
 gattggctcc aattcttggg gtggtgaatc cgttagcag gtgccgcggc cttccattca 1680  
 ggtcagagtg gcccggtcc atgcaccgcg acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag 1740  
 ggcggcgcct acaatccatg ccaaccggtt ccatgtgctc gccgagggcg cataaatcgc 1800  
 cgtgacgatc agcgggtcaa tgatcgaagt taggctggta agagccgcga gcgatccttg 1860  
 aagctgtccc tgatggctgt catctacctg cctggacagc atggcctgca acgcgggcat 1920  
 cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat aatggggaag gccatccagc ctgcgctcgc 1980  
 gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgct gcccgccatg ccggcgataa tggcctgctt 2040  
 ctgcgccaaa cgtttgggtg cgggaccagt gacgaaggct tgagcagagg cgtgcaagat 2100  
 tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat cgtcgcgctc cagcgaaaagc ggtcctcgcc 2160  
 gaaaatgacc cagagcgcct cgggcacctg tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt 2220  
 cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa 2280  
 ggctctcaag ggcacggctc gacgctctcc cttatgcgac tcctgcatta ggaagcagcc 2340  
 cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc cgccgcaagg aatggtgcat gcaaggagat 2400  
 ggcgcccaac agtcccccg ccacggggcc tgccaccata cccacgccga aacaagcgcct 2460  
 catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc cccatcggtg atgtcggcga tataggcgcc 2520  
 agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgc ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcca 2580  
 caggacgggt gtggctgcca tgatcgcgta gtcgatagtg gctccaagta gcgaagcag 2640  
 caggactggg cggcgcccaa agcggctcga cagtgtccg agaacgggtg cgcatagaaa 2700  
 ttgcatcaac gcatatagcg ctagcagcac gccatagtga ctggcgatgc tgtcggaatg 2760  
 gacgatatcc cgcaagaggc ccggcagtac cggcataacc aagcctatgc ctacagcatc 2820

ES 2 867 964 T3

caggggtgacg gtgccgagga tgacgatgag cgcattgtta gatttcatac acgggtgcctg 2880  
 actgcgtttag caatttaact gtgataaact accgcattaa agcttatcga tgataagctg 2940  
 tcaaacatgg caggcctccc ccagaagtcg cttgcgggat tcggaatcct gcacgcctc 3000  
 gctcaagcct tcgtcactgg tcccgccacc aaacgtttcg gcgagaagca ggccattatc 3060  
 gcggcatgg cggccgacgc gctgggctac gtcttgctgg cgttcgcgaa cgcagcaag 3120  
 acgtagccca gcgcgtcggc cagcttgcaa ttcgcgctaa cttacattaa ttgcggtgcg 3180  
 ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca 3240  
 acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgccagggg ggtttttctt ttcaccagtg 3300  
 agacgggcaa cagctgattg cccttcaccg cctggccctg agagagtgc agcaagcgg 3360  
 ccacgctggg ttgccccagc aggcgaaaat cctgtttgat ggtggttgac ggccggatat 3420  
 aacatgagct gtcttcggtg tcgtcgtatc ccaactaccg gatatccgca ccaacgcgca 3480  
 gcccgactc ggtaatggcg cgcattgcgc ccagcgcct ctgatcgttg gcaaccagca 3540  
 tcgcagtggg aacgatgcc tcattcagca tttgcatggt ttgttgaaaa ccggacatgg 3600  
 cactccagtc gccttcccgt tccgctatcg gctgaatttg attgcgagtg agatatttat 3660  
 gccagccagc cagacgcaga cgcgccgaga cagaacttaa tgggcccgct aacagcgcga 3720  
 tttgctggtg acccaatgcg accagatgct ccacgccag tcgcgtaccg tcttcatggg 3780  
 agaaaataat actgttgatg ggtgtctggt cagagacatc aagaaataac gccggaacat 3840  
 tagtgcaggc agcttcaca gcaatggcat cctggtcac cagcggatag ttaatgatca 3900  
 gccactgac gcgttgcgcg agaagattgt gcaccgccgc tttacaggct tcgacgccgc 3960  
 ttcgttctac catcgacacc accacgctgg caccagttg atcggcgcga gatttaatcg 4020  
 ccgcgacaat ttgcgacggc gcgtgcaggg ccagactgga ggtggcaacg ccaatcagca 4080  
 acgactgttt gcccgccagt tgttggtgcca cgcggttggg aatgtaattc agctccgcca 4140  
 tcgccccttc cactttttcc cgcgttttcg cagaaacgtg gctggcctgg ttcaccacgc 4200  
 gggaaaacgg ctgataagag acacccgcat actctgcgac atcgtataac gttactgggt 4260  
 tcacattcac caccctgaat tgactctctt ccgggcgcta tcatgccata ccgcgaaagg 4320  
 ttttgacca ttcgatgggt tcaacgtaaa tgcagccgc ttcgccttcg cgcgcgaatt 4380  
 gcaagctgat ccgggcttat cgactgcacg gtgcaccaat gcttctggcg tcaggcagcc 4440  
 atcgggaagct gtggtatggc tgtgcaggtc gtaaatcact gcataat 4487

## REIVINDICACIONES

- 1.- Cepa de microorganismos para la producción de sustancias o proteínas de bajo peso molecular que contienen en su genoma una mutación en un gen, que provoca una auxotrofia de la cepa, así como un plásmido de producción que codifica al menos una enzima para la producción de una sustancia de bajo peso molecular o al menos una proteína recombinante, así como una copia funcional del gen, cuya desactivación cromosómica provoca la auxotrofia, caracterizada por que, en el caso de la auxotrofia, se trata de una auxotrofia no alimentable y se trata del gen *pyrH* con la la SEQ ID nº 1 o de un gen homólogo a *pyrH*, debiéndose entender por una auxotrofia no alimentable el hecho de que la auxotrofia reduzca el crecimiento de células de microorganismo o provoque la muerte de células de microorganismo, y no sea suplementable mediante adición de productos previos, intermedios y/o finales específicos del metabolismo en el medio de crecimiento, y tratándose, en el caso de genes homólogos a *pyrH*, de genes que codifican para una proteína con actividad de PyrH y presentan una identidad de secuencia mayor que 30 % respecto a SEQ ID nº. 1.
- 2.- Cepa de microorganismos según la reivindicación 1, caracterizada por que la mutación del gen, que provoca la auxotrofia alimentable de la cepa, conduce a la desactivación de este gen.
- 3.- Cepa de microorganismos según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que la mutación del gen que provoca la auxotrofia no alimentable de la cepa conduce a la desactivación de la actividad del producto génico codificado a través del gen.
- 4.- Procedimiento para la producción de una cepa según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que en una cepa de microorganismos, que posee el gen *pyrH* o un gen homólogo a *pyrH*, se introduce un plásmido sensible a la temperatura, que posee una copia funcional del gen *pyrH* o su gen homólogo, que se debe mutar o eliminar, a continuación se muta el genoma de la cepa de modo que la cepa en el gen *pyrH* o el gen homólogo a *pyrH* presenta una mutación que conduce a una auxotrofia no alimentable en la cepa, y en esta cepa se sustituye a continuación el plásmido sensible a la temperatura por un plásmido de producción a temperatura no permisiva, conteniendo el plásmido de producción al menos un gen que codifica una enzima para la producción de una sustancia de bajo peso molecular o al menos una proteína recombinante, así como una copia funcional del gen *pyrH*, tratándose, en el caso de genes homólogos a *pyrH*, de genes que codifican para una proteína con actividad de PyrH y presentan una identidad de secuencia mayor que 30 % respecto a SEQ ID nº. 1.
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que el plásmido sensible a la temperatura presenta un origen de replicación sensible a la temperatura.
- 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que las células, inmediatamente tras la transformación con el plásmido de producción, se exponen a un choque térmico a 47-55°C durante 30-90 min, y a continuación se efectúa la incubación ulterior a la temperatura no permisiva de 37-45°C.
- 7.- Procedimiento para la producción de sustancias o proteínas de bajo peso molecular por medio de una cepa de microorganismos en un medio de fermentación, que está caracterizado por que se emplea una cepa de microorganismos según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3 y se utiliza un medio de fermentación exento de antibióticos.

Fig. 1: pKD46

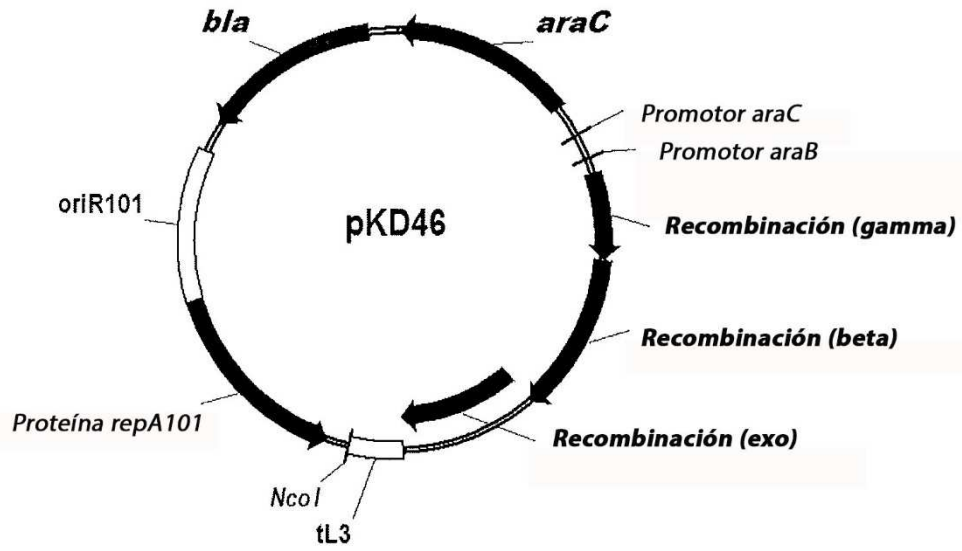


Fig. 2: pAF-ts-pyrH

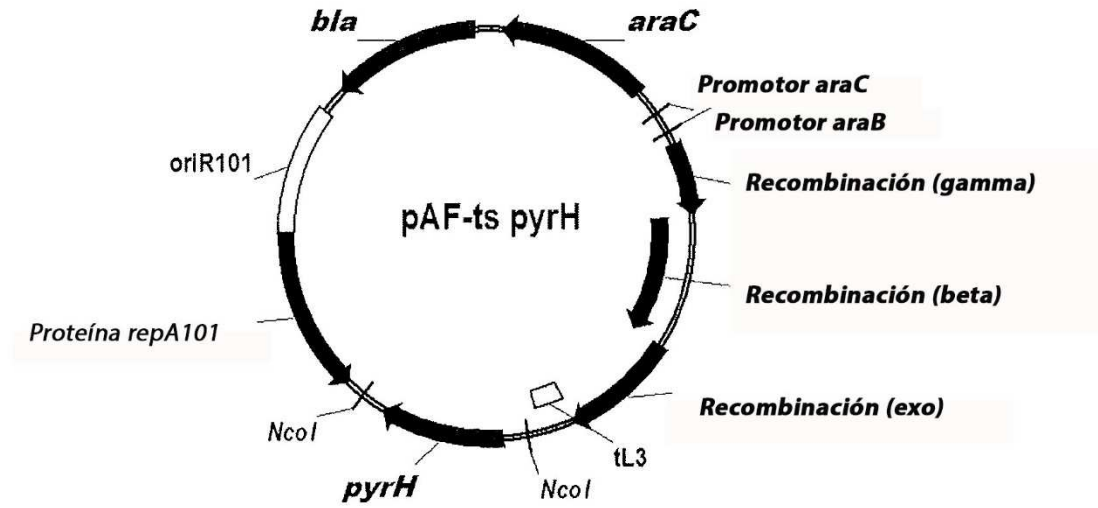


Fig. 3: pAF-ts-plsC

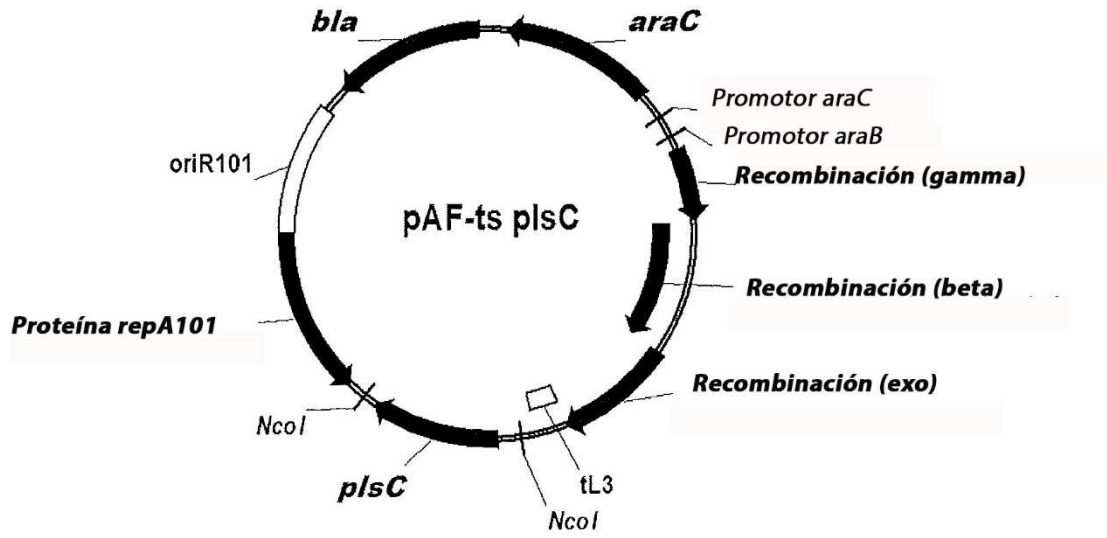


Fig. 4: pMT1

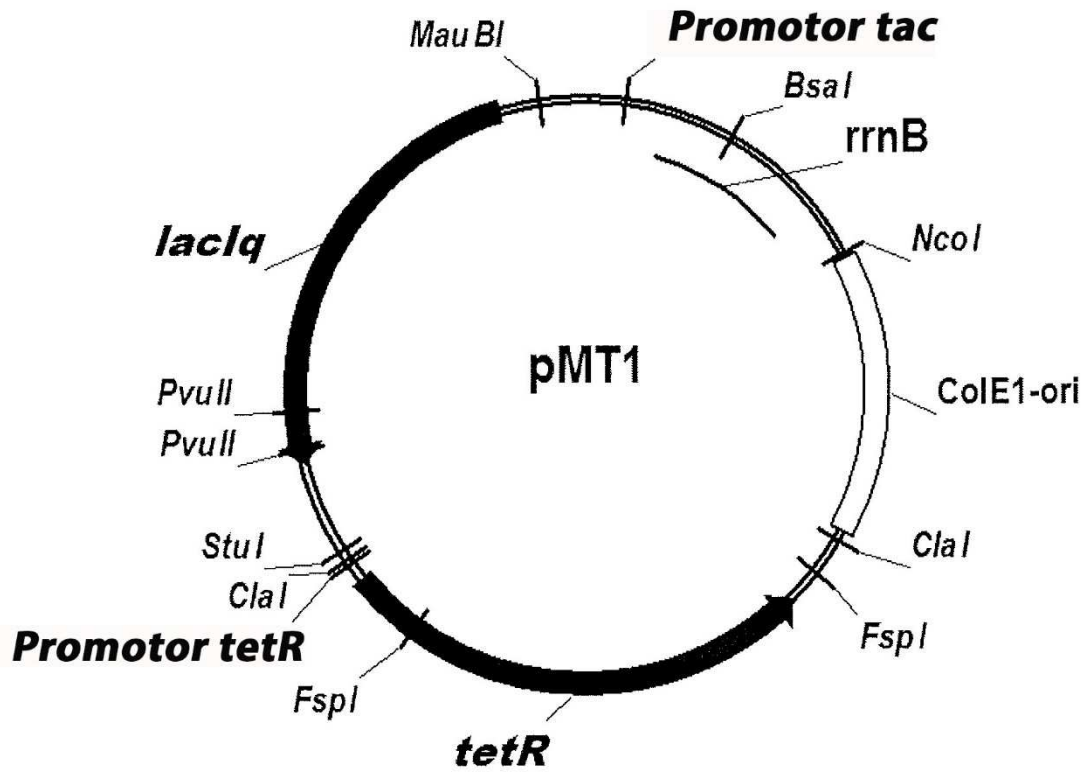


Fig. 5: pcysEX-GAPDH-ORF306\_tetR

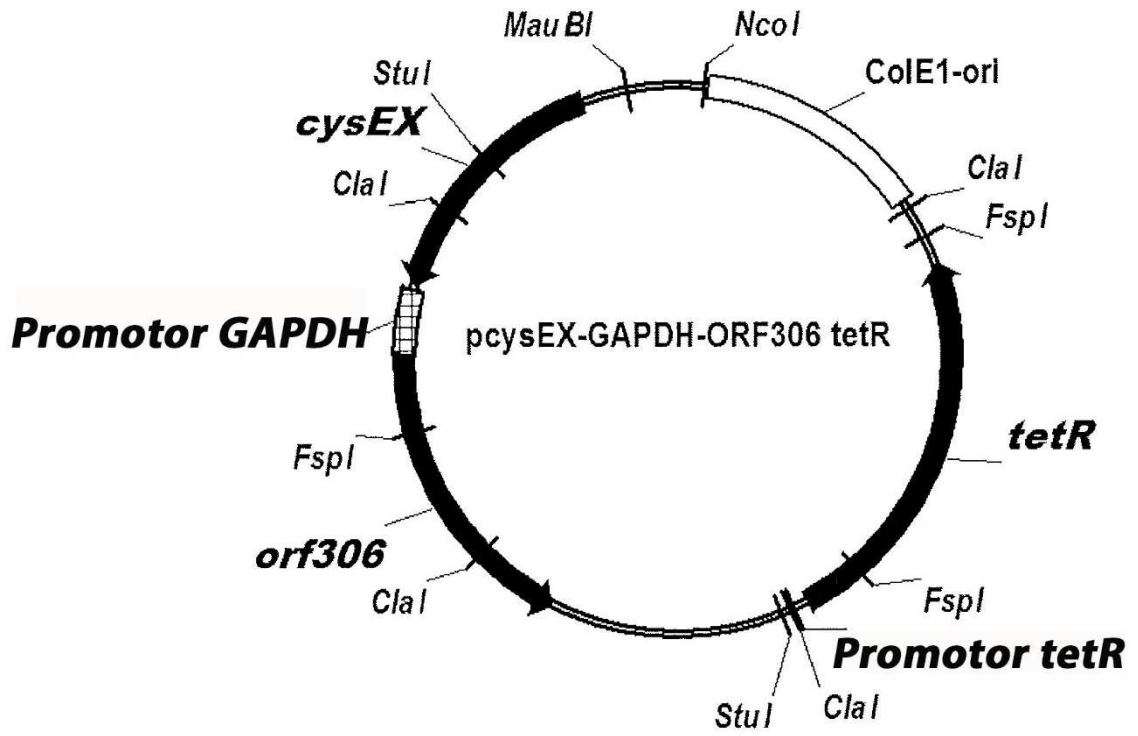


Fig. 6: pCGT\_tetR

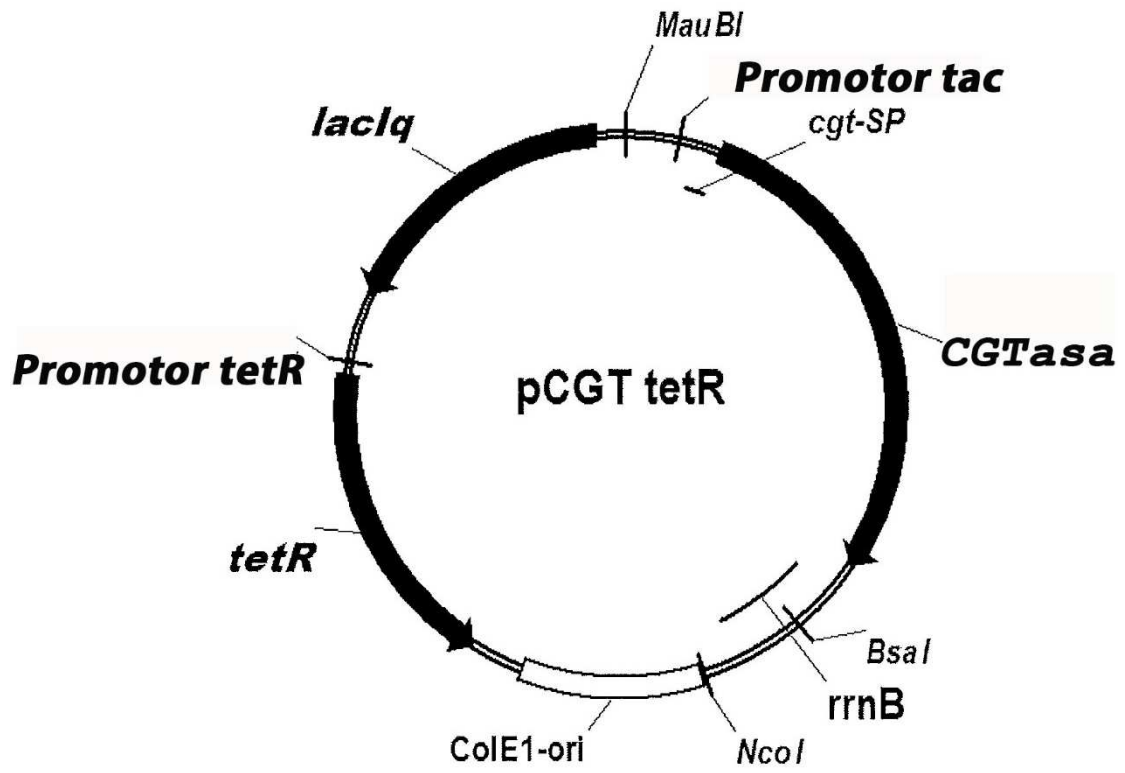


Fig. 7: pFab-anti-lisozima\_tetR

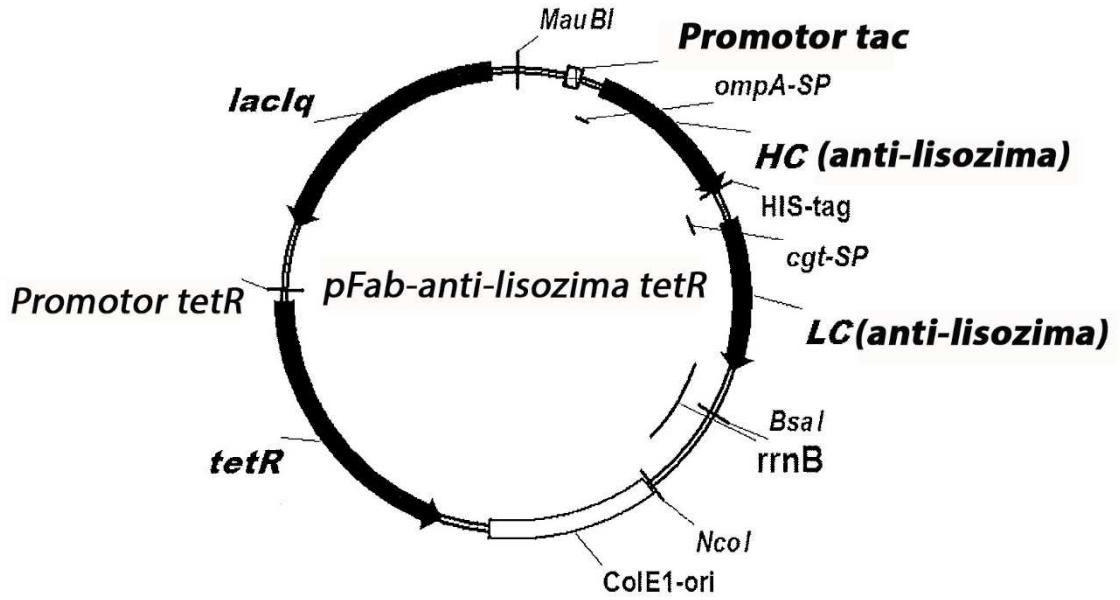


Fig. 8: pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH1\_tetR

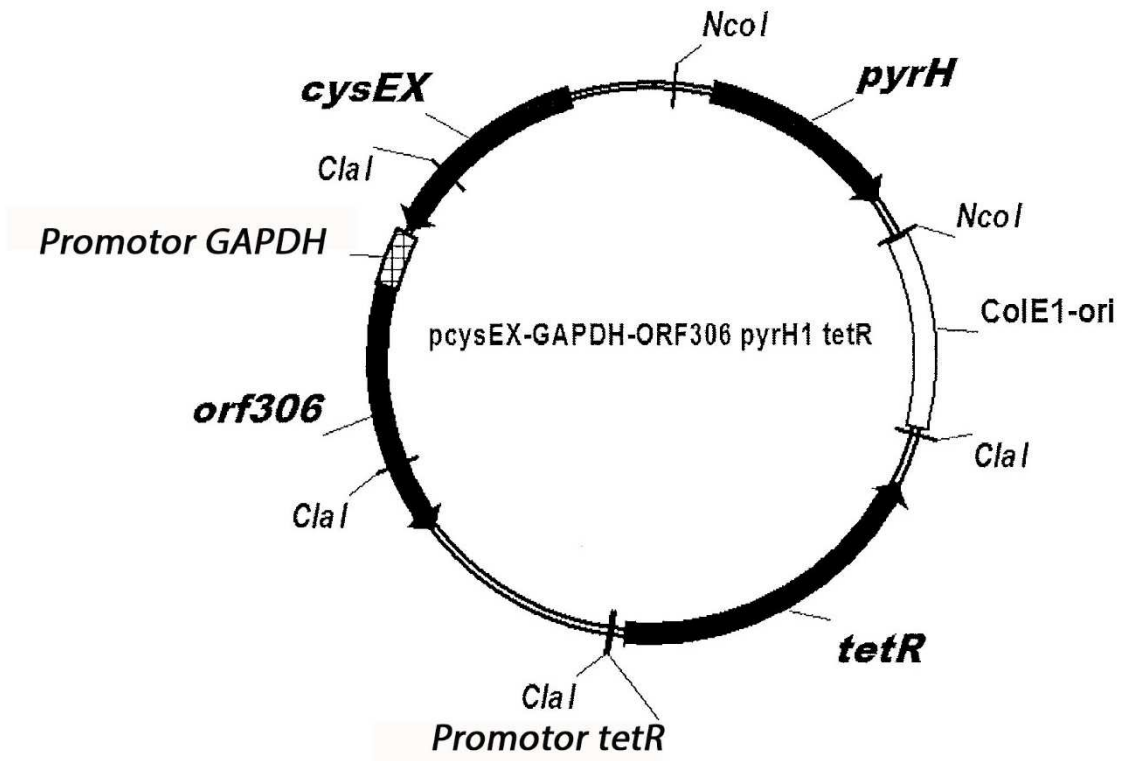


Fig. 9: pCGT\_pyrH1\_tetR

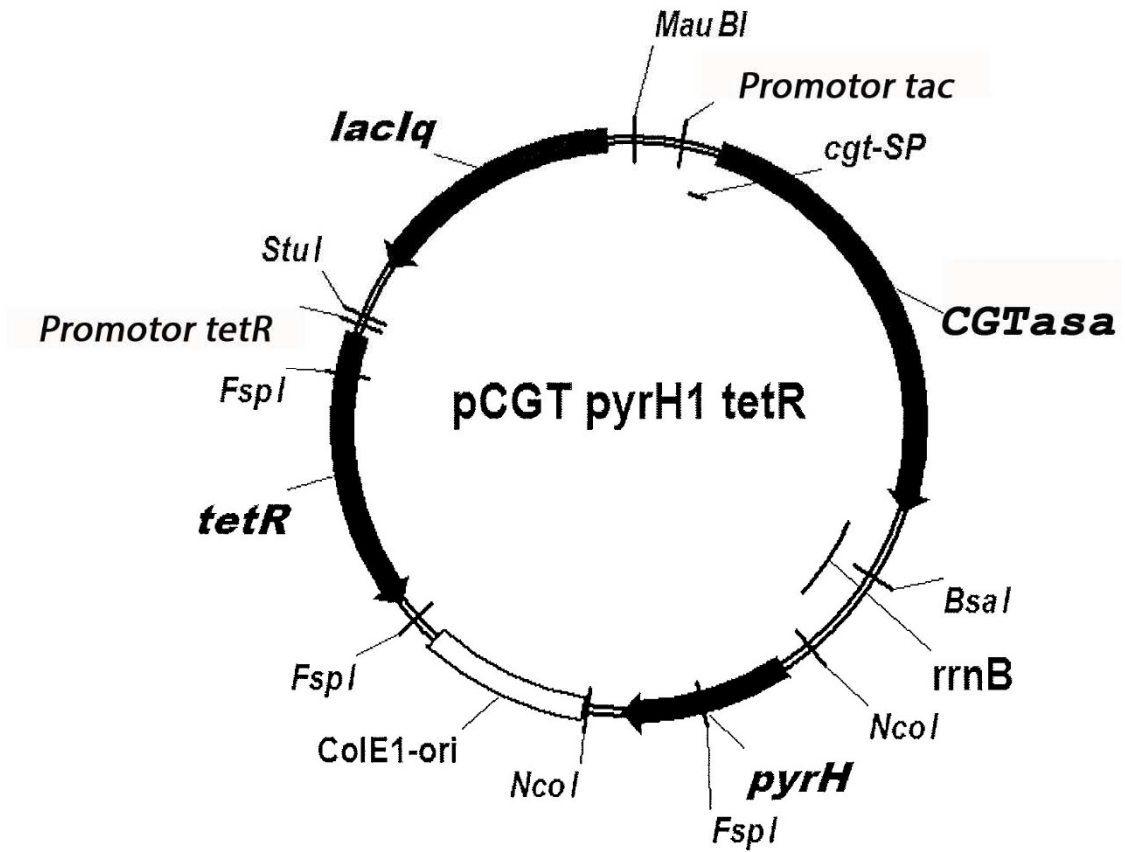


Fig. 10: pFab-anti-lisozima\_pyrH1\_tetR

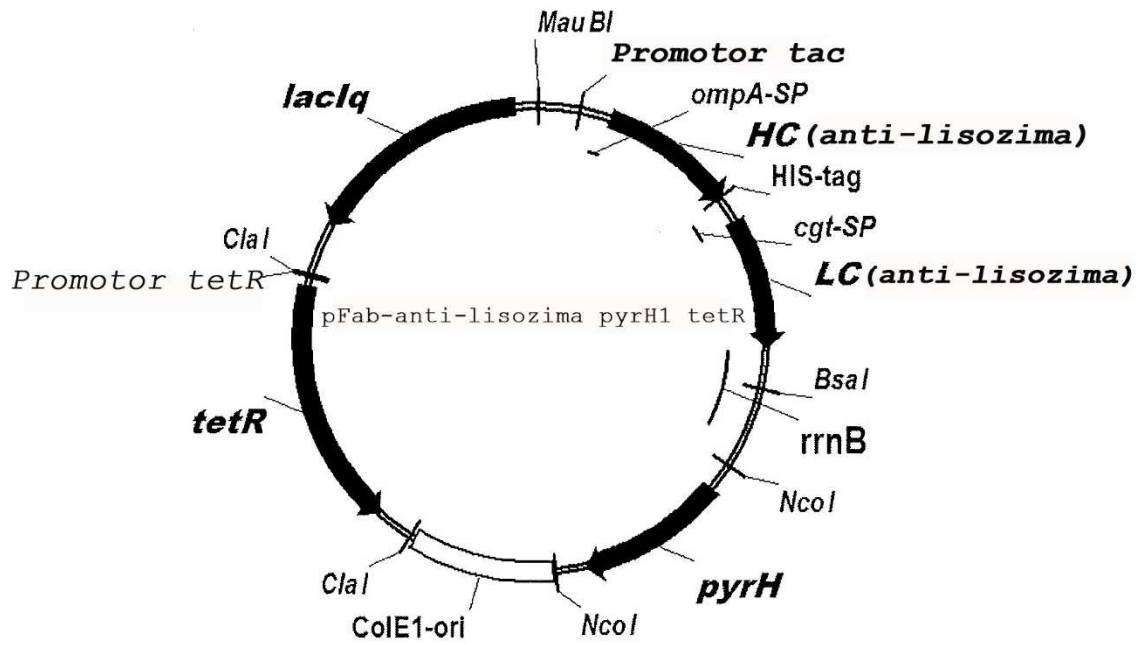


Fig. 11: pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC1\_tetR

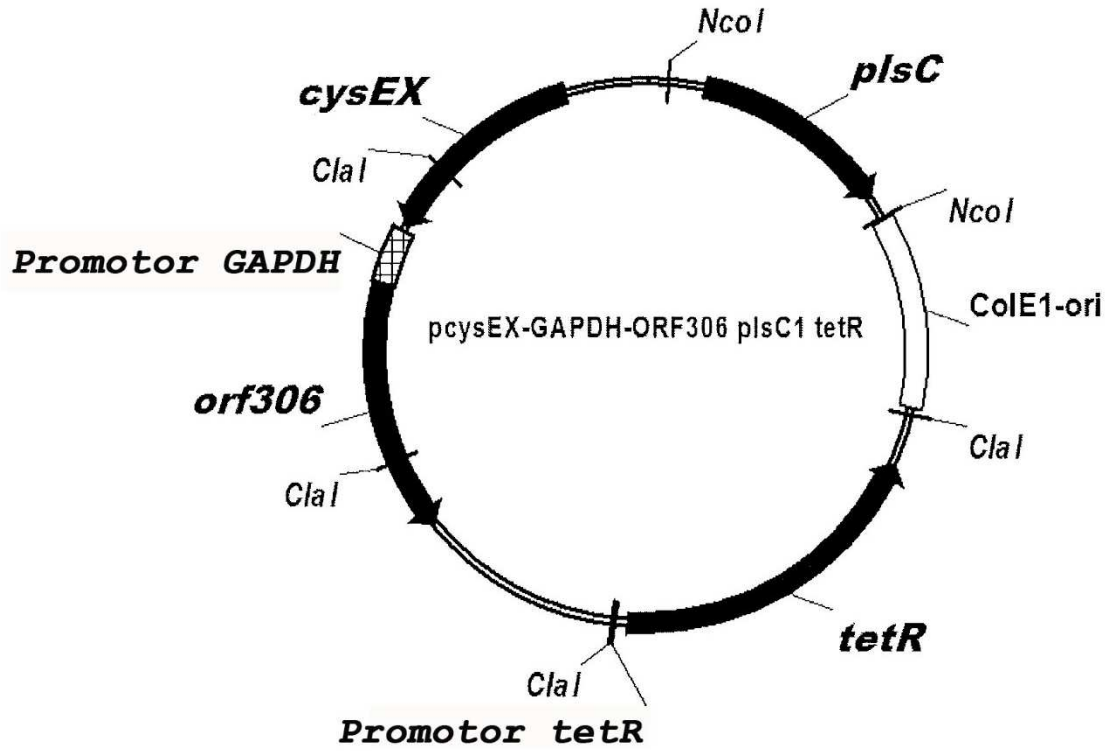


Fig. 12: pCGT\_plsC1\_tetR

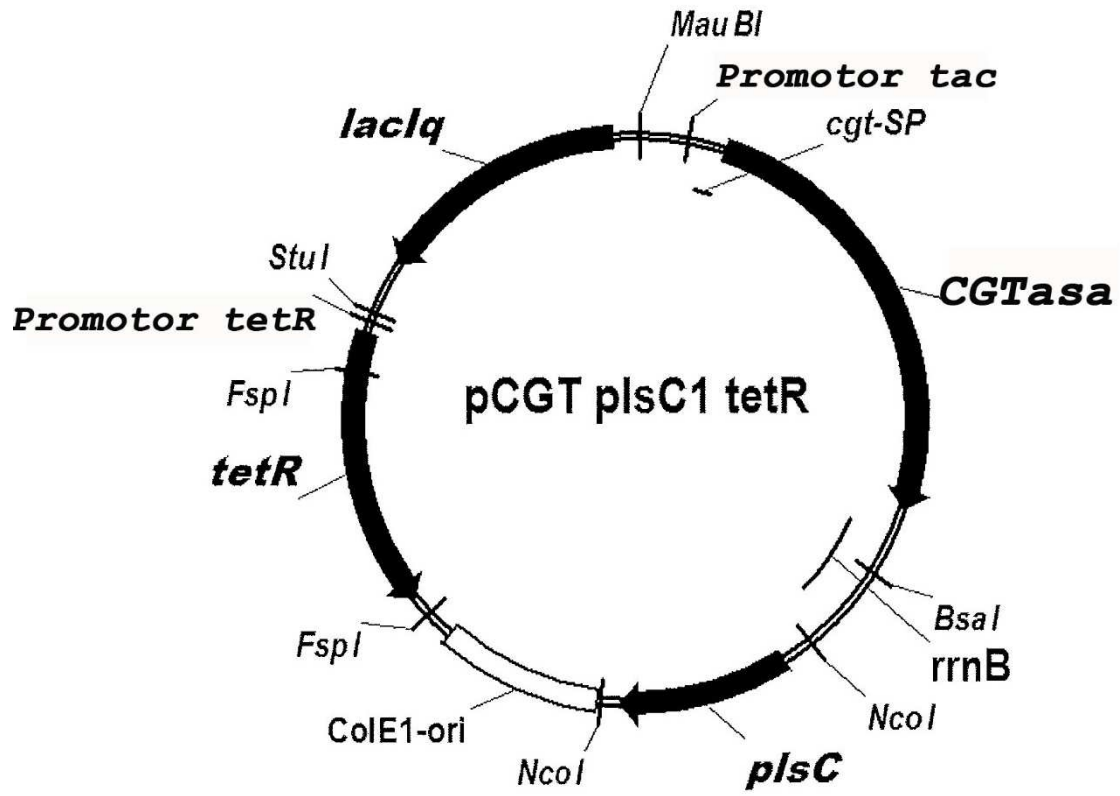


Fig. 13: pFab-anti-lisozima\_plsC1\_tetR

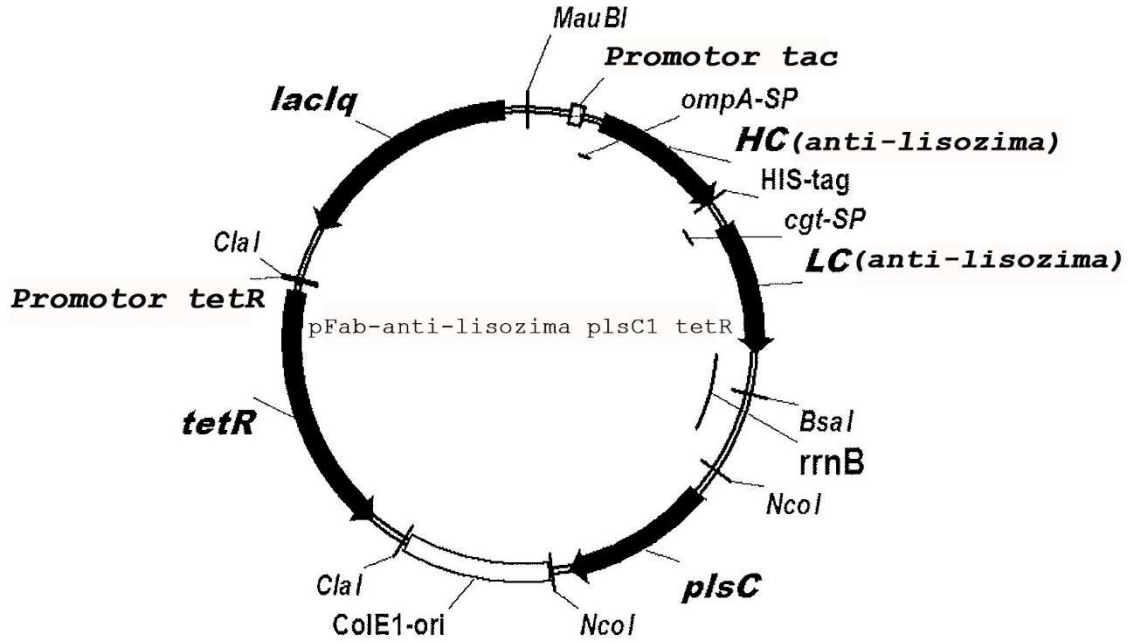


Fig. 14: pcysEX-GAPDH-ORF306\_pyrH

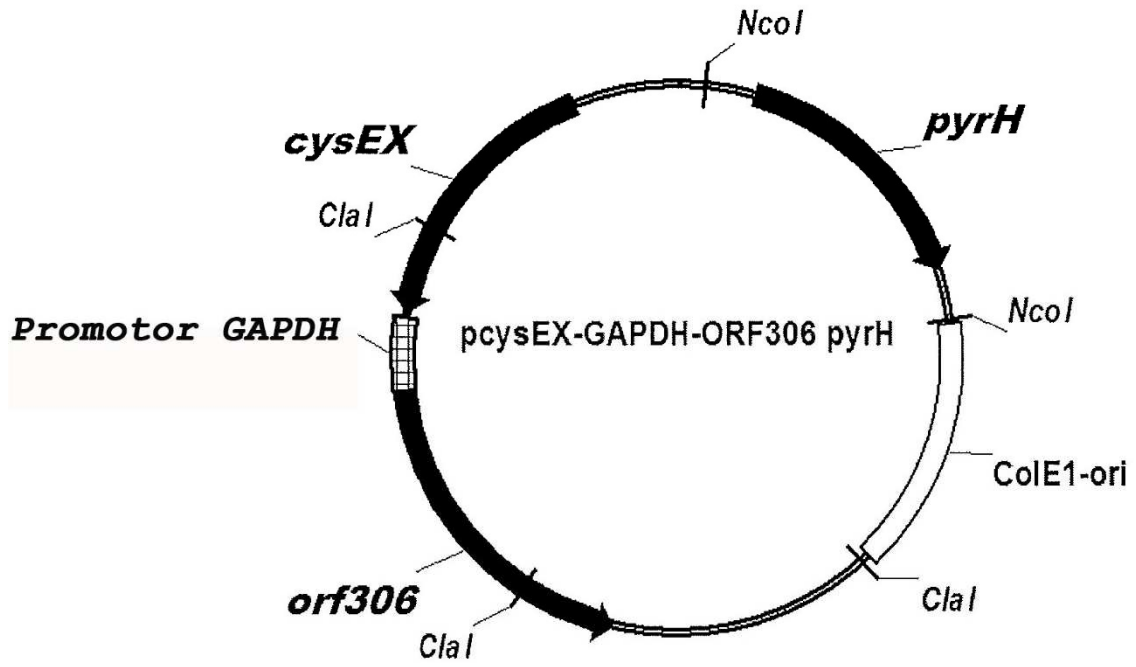


Fig. 15: pCGT\_pyrH

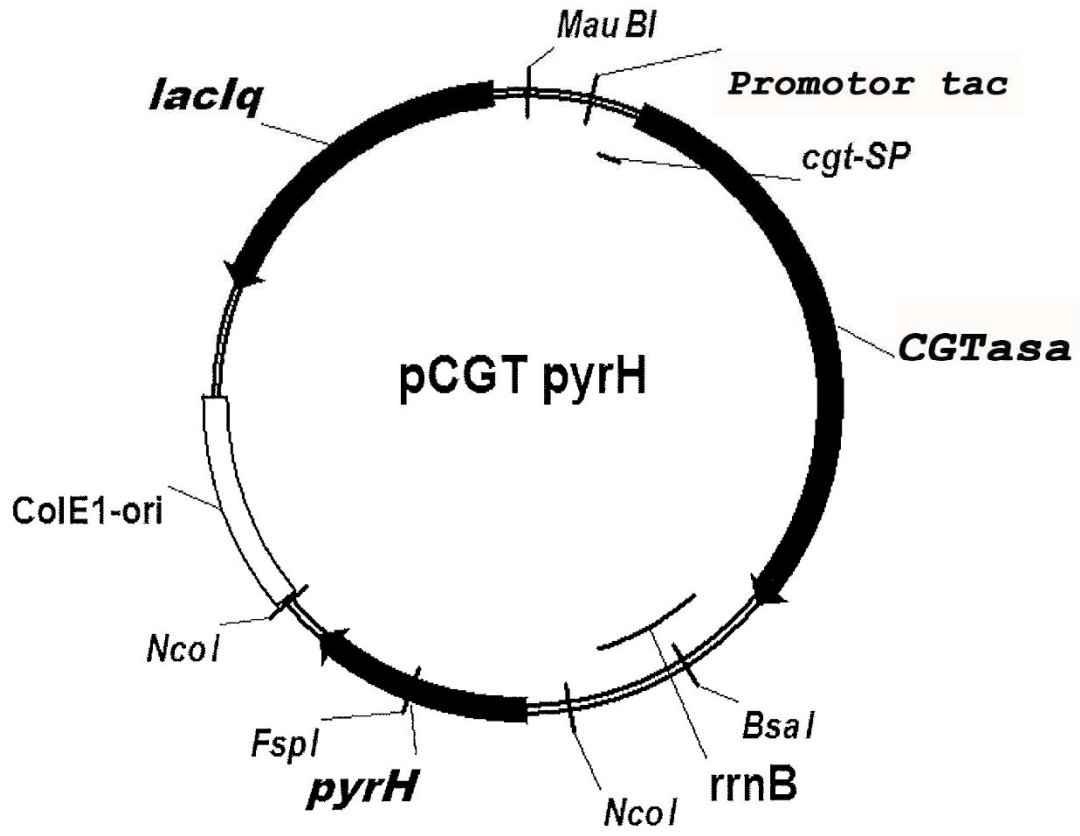


Fig. 16: pFab-anti-lisozima\_pyrH

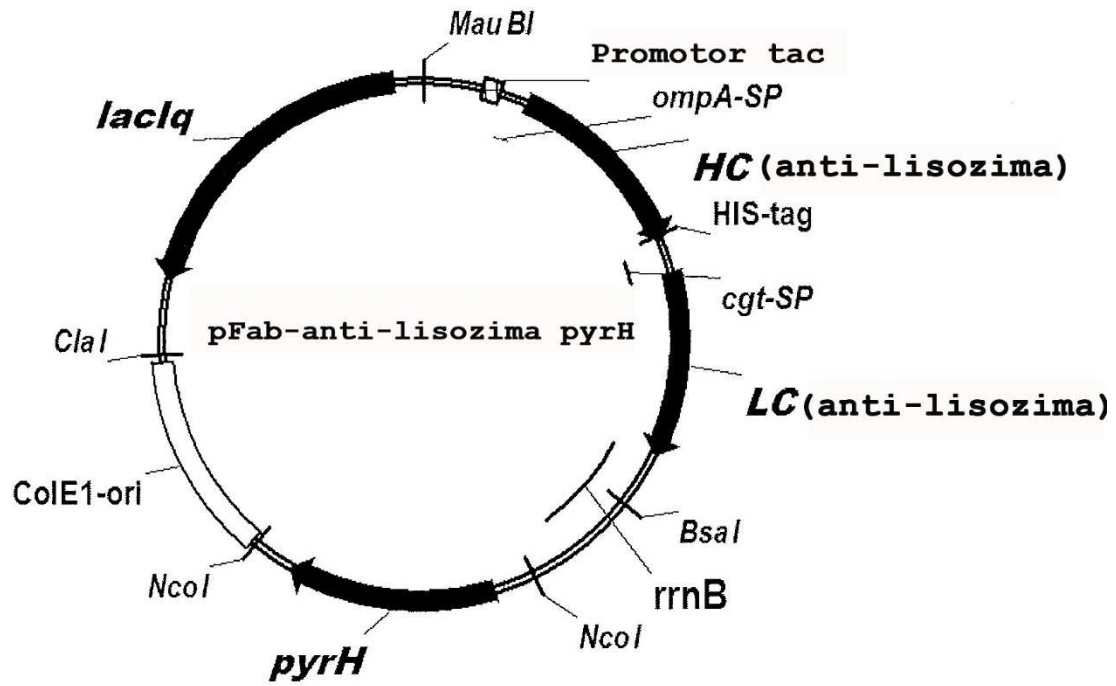


Fig. 17: pcysEX-GAPDH-ORF306\_plsC

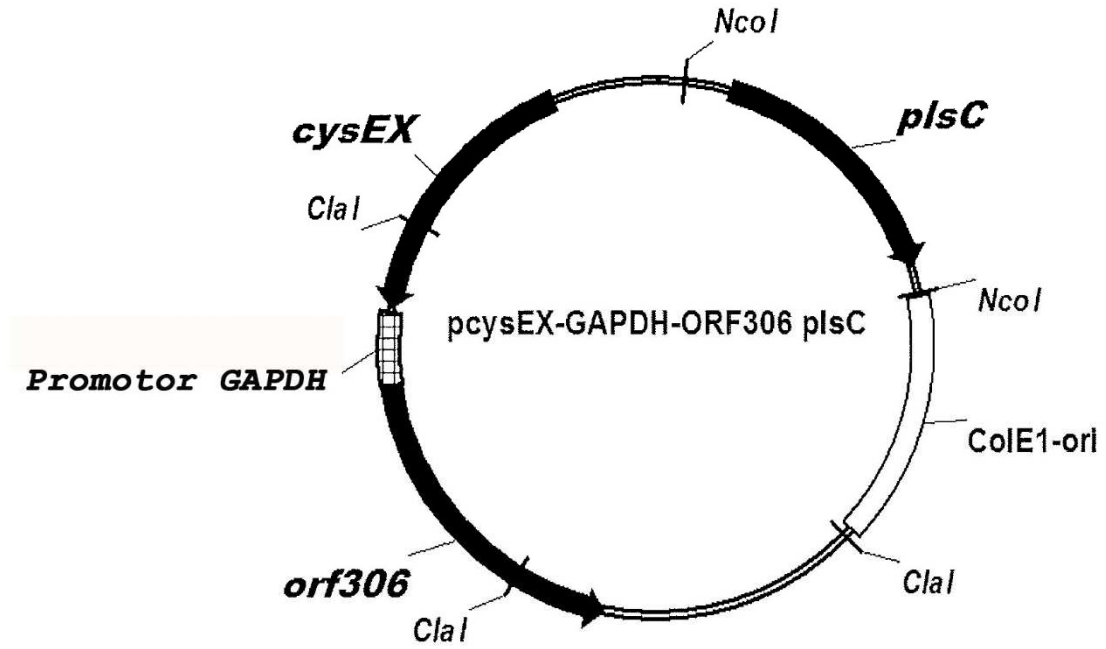


Fig. 18: pCGT\_plsC

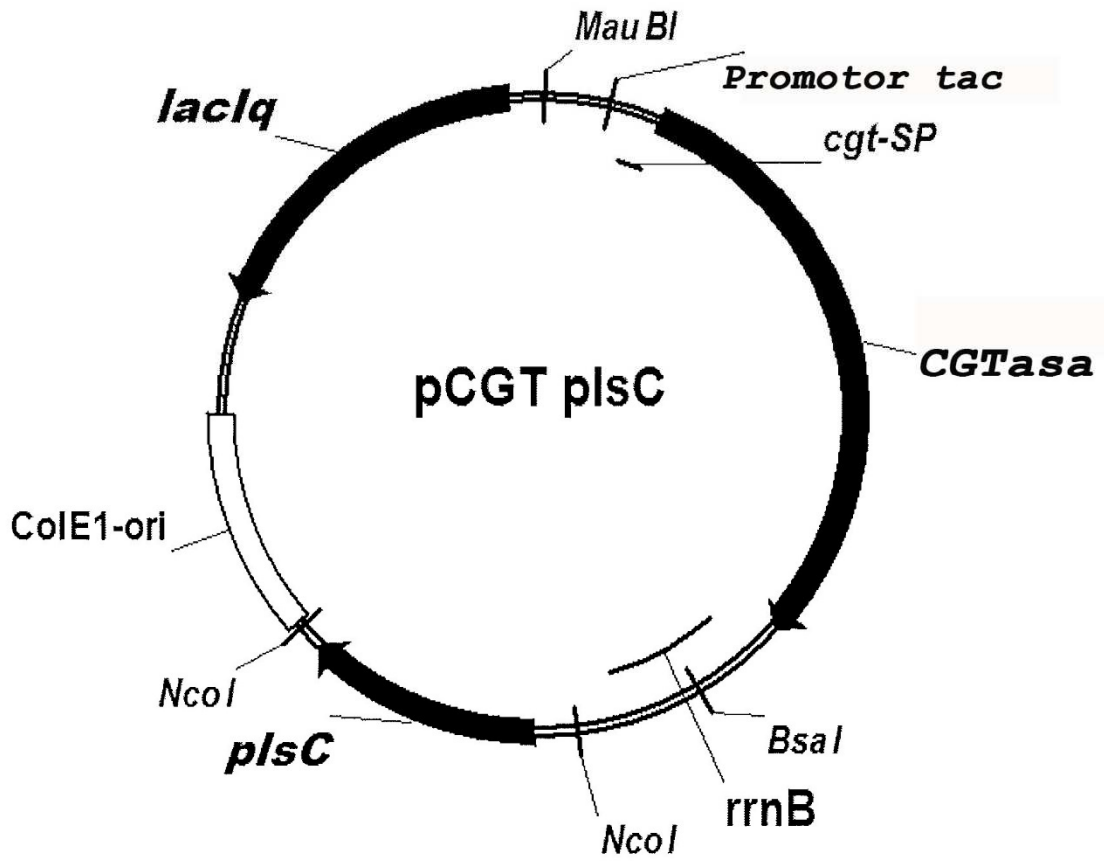


Fig. 19: pFab-anti-lisozima\_plsC

