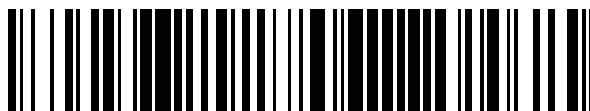


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 857**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 19/38 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007 E 07704356 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1981972**

54 Título: **Nuevo procedimiento**

30 Prioridad:

06.02.2006 GB 0602339

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

03.07.2013

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, DAVID, MARTIN;
COLLIS, ANDREW, JOHN;
LIU, LIN;
PODKOVYROV, SERGEY y
PRESTON, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 410 857 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

Nuevo procedimiento

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere a la producción biológica de timidina. Más particularmente, la misma se refiere a un método que utiliza materiales biológicos manipulados genéticamente. Los materiales biológicos manipulados genéticamente pueden incluir un organismo productor de timidina, tal como una bacteria o uno o más constructos de DNA, por ejemplo plásmidos, que en combinación con una célula hospedadora adecuada conducirán, cuando se desarrollan en un medio de cultivo apropiado, a la producción biológica de timidina.

Antecedentes de la Invención

- 10 El desoxirribonucleósido de pirimidina timidina es útil como compuesto farmacéutico intermedio. El mismo es particularmente importante para la síntesis química del AZT, conocido también como zidovudina o azidotimidina. Este es un fármaco antirretroviral de la clase de los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NRTI), que, bajo la marca comercial Retrovir, fue el primer fármaco autorizado para tratar la infección de HIV.

- 15 El HIV/SIDA se trata usualmente con combinaciones de tres o más fármacos antirretrovirales (De Clercq, *Med. Chem. Res.* **13**: 439-478, 2004). AZT tiene un papel importante y expandido como componente principal de terapias de combinación y es vendido bajo una diversidad de marcas comerciales que incluyen Retrovir, Zidovir, Viro-Z, Aviro-Z y Zido-H.

- 20 AZT es particularmente valioso cuando se combina con el fármaco NRTI 3TC (lamivudina). Estos dos fármacos están disponibles, formulados en una sola píldora, bajo las marcas comerciales Combivir y Duovir. Una combinación NRTI triple de AZT, 3TC y abacavir se vende bajo la marca comercial Trizivir. Otros fármacos NRTI utilizados en conjunción con AZT incluyen didanosina, emtricitabina y zalcitabina.

AZT es útil también en combinación con fármacos inhibidores de la proteasa de HIV que incluyen amprenavir, atazanavir, indinavir, ritonavir y saquinavir, y con inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos (NNRTI) que incluyen delavirdina, efavirenz y nevirapina.

- 25 AZT es el único fármaco anti-HIV aprobado para uso durante el embarazo (Lyll, *et al.*, *HIV Med.* **2**: 314-334, 2001). En 1997, aproximadamente 600.000 niños murieron de SIDA contraído por transmisión de la madre al bebé. AZT, tomado durante el último trimestre del embarazo, puede reducir el riesgo de transmisión viral en un 67% (Mitchla & Sharland, *Expert Opin. Pharmacother.* **1**: 239-248, 2000).

- 30 La tecnología de fermentación es una alternativa atractiva a la síntesis química para la preparación comercial de las grandes cantidades de timidina requeridas para la fabricación de AZT. Los procesos de fermentación están bien establecidos en la industria como medio para producir moléculas biológicas tales como antibióticos, aminoácidos y vitaminas en gran escala y con costes relativamente bajos (Atkinson, & Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, 2nd Edition, New York, Stockton Press, 1991).

- 35 Sin embargo, la timidina no se encuentra usualmente en su forma "libre" en la naturaleza, sino que se produce como el ácido monofosfato-timidílico y se incorpora en el DNA como el trifosfato. Los sistemas biológicos no producen naturalmente cantidades significativas de timidina, por lo que se requiere un mutante u organismo modificado por ingeniería genética.

- 40 En EP 0.344.937 se dan a conocer cepas de *Brevibacterium* seleccionadas para producir timidina en cultivo aerobio. Se hace referencia también a una publicación de patente japonesa No. 39-16345, que expone el uso de una cepa mutante de *Bacillus subtilis* en la producción por fermentación de un polisacárido que contiene timidina.

En US 5.213.972 (McCandliss & Anderson), se da a conocer un proceso para la producción de desoxirribonucleósidos de pirimidina (PdN) tales como timidina y 2'-desoxiuridina. Se propone un microorganismo replicable, que incorpora y expresa una secuencia de DNA que codifica una PdN-fosfohidrolasa que convierte un PdN-monofosfato en un PdN.

- 45 Más particularmente, McCandliss & Anderson, supra, describen un método de fermentación que puede utilizarse para producir timidina que implica la expresión de desoxitimidilato-fosfohidrolasa (dTMPasa) a partir del bacteriófago PBS1 de *Bacillus subtilis*. Este tipo de enzima se encuentra en la naturaleza expresada por bacteriófagos que incorporan PdNs tales como 2'-desoxiuridina o 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina en su DNA en lugar de timidina.

- 50 En la fermentación de timidina descrita en US.5.213.972, las enzimas que degradan la timidina (timidina-fosforilasa y uridina-fosforilasa), se han eliminado por mutación, con lo que se acumula timidina. Así, el uso de la enzima

dTMPasa contribuye a crear el camino que permite la síntesis de timidina. Una expresión de dTMPasa sola, sin embargo, no puede asegurar un nivel comercialmente viable de producción de timidina.

En WO 01/02580, se describen mejoras que dan como resultado la producción incrementada de timidina por células que expresan dTMPasa.

5 No obstante, un problema en la fabricación de timidina producida biológicamente reside en la producción concomitante de 2'-desoxiuridina (UdR) en el proceso de fermentación. Las dos moléculas tienen propiedades similares, difiriendo en estructura por un solo grupo metilo, y su separación durante el procesamiento aguas abajo es difícil y costosa. Para una aplicación farmacéutica, tal como la síntesis de AZT, puede requerirse timidina de alta pureza con niveles bajos de UdR.

10 Sería ventajoso que la timidina producida biológicamente por fermentación diera niveles significativamente reducidos de UdR comparada con los procesos corrientes, de tal modo que el requerimiento para la purificación aguas abajo a fin de eliminar este material se minimizara o eliminara.

15 Por significativamente reducido se entiende que los niveles (contaminantes) de UdR constituyen menos de 25%, más preferiblemente menos de 10%, todavía más preferiblemente menos de 5%, pasando por 4%, 3%, y 2%, hasta niveles de 1% e inferiores en el producto timidina fermentado.

20 Idealmente, deberían alcanzarse niveles "altos" de timidina. Los niveles de timidina pueden expresarse como cifras de "productividad específica" en las que la medida se determina 4-6 horas después de la inducción. Se prefieren niveles mayores que 5 mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas, más particularmente mayores que 10 mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas y más preferiblemente cifras de productividad específica mayores que 15 a 20 y 25.

Estos niveles deberían obtenerse muy preferiblemente con los niveles reducidos de UdR arriba descritos y por consiguiente pueden combinarse de tal manera que, por ejemplo, pudiera obtenerse un título de TdR de 5 g/l que contenga menos de, por ejemplo, 5% de UdR.

25 De hecho, el proceso de la técnica anterior, que utiliza el plásmido pCG532 en la cepa hospedadora CMG2451, como se da a conocer en WO 01/02580, produce un contenido medio de UdR en tests en matraces de sacudidas de 34,5%. A tales niveles, el procesamiento aguas abajo para separar timidina de UdR es difícil y costoso.

Es una finalidad de la presente invención modificar organismos productores de timidina de tal manera que los mismos produzcan timidina sin producción concomitante significativa de UdR.

30 Como se utiliza en esta memoria, el término "organismo" incluye un organismo que pueda producir timidina por expresión del DNA codificado en su cromosoma (como se expone, por ejemplo, en EP0344937) o DNA que hospeda la misma (como se expone, por ejemplo, en US 5.213.972 y WO 01/2580). Este DNA hospedador puede estar presente como uno o más constructos de DNA, tales como, por ejemplo, uno o más plásmidos.

En particular, es una finalidad proporcionar una mejora en la calidad de la timidina producida en comparación con la combinación constructo/hospedador dada a conocer en WO 01/2580.

35 Es una finalidad adicional asegurar que cualquier modificación génica realizada en un constructo sea estable de tal manera que cuando el constructo se introduce en una célula hospedadora, y se deja crecer la combinación, el hospedador sea incapaz de propagarse por sí mismo sin que esté presente el constructo, es decir que, si el constructo se pierde, el organismo muere.

Sumario de la Invención

40 Inesperadamente, se ha encontrado que existe un paso significativo limitante de la velocidad en la producción de timidina que ocurre alrededor de la conversión de dUMP en dTMP, de tal manera que puede dirigirse simultáneamente dUMP hacia la producción de UdR. Esta limitación no puede atenuarse por simple sobreexpresión de la enzima timidilato-sintasa, que cataliza la reacción de conversión. Sin embargo, asegurándose de la disponibilidad de un suministro fácil de grupos metilo donantes, la Solicitante ha establecido que puede producirse 45 timidina con una reducción significativa en los niveles de UdR contaminante (desde alrededor de 35% a menos de 5%, y en algunos casos menos de 1%).

50 La presente invención proporciona un organismo capaz de producir timidina cuando se desarrolla en un medio de cultivo, comprendiendo el organismo una o más modificaciones genéticas en su DNA, o DNA extracromosómico necesario para su crecimiento, caracterizado porque el organismo comprende una o más modificaciones genéticas que dan como resultado el camino biosintético de timidina produciendo preferentemente a expensas de UdR

como consecuencia de una o más modificaciones genéticas que aumentan la disponibilidad de una unidad de un solo carbono para conversión de dUMP en dTMP.

Las una o más modificaciones son preferiblemente modificaciones que aumentan la cantidad de 5,10-metilenotetrahidrofolato (CH₂-THF) disponible para la timidilato-sintasa para conversión de dUMP en dTMP. CH₂-THF es un donante común de unidades de un solo carbono para ambas clases conocidas de timidilato-sintasa (EC 2.1.1.45 y EC 2.1.1.148). Las reacciones catalizadas por estas dos enzimas se comparan en la Figura 2.

En la mayoría de los casos, los átomos de hidrógeno requeridos para reducir el grupo metileno de la molécula donante a un grupo metilo son proporcionados por el propio CH₂-THF, de tal modo que la conversión de dUMP en dTMP requiere la conversión simultánea de CH₂-THF en dihidrofolato (DHF). Esta forma de la enzima se designa EC 2.1.1.45 y es codificada, por ejemplo, por el gen *thyA* de *E. coli* o el gen *td* del bacteriófago T4.

En una forma alternativa de la enzima designada EC 2.1.1.148 y codificada, por ejemplo, por el gen *thyX* de *Helicobacter pylori*, se proporcionan dos átomos de hidrógeno por la forma reducida de un nucleótido de flavina tal como flavina-adenina-dinucleótido (FAD). En este caso, CH₂-THF se convierte en tetrahidrofolato (THF) y FADH₂ en FAD en la reacción de la timidilato-sintasa (Mylykallio, H. *et al.*, 297: 105-107, 2002).

CH₂-THF se regenera normalmente por transferencia de una unidad de un solo carbono a THF. En un organismo que utiliza la timidilato-sintasa EC 2.1.1.45 debe tener lugar, como primer paso, la conversión de DHF en THF por la acción de una dihidrofolato-reductasa (ec1.1.5.3), expresada por ejemplo por un gen *folA* de *E. coli* o un gen T4 *frd*. Con la forma EC 2.1.1.148 de timidilato-sintasa este paso no es necesario.

La ruta metabólica primaria para generar CH₂-THF a partir de DHF es un camino que pasa por los aminoácidos serina y glicina, partiendo de 3-fosfoglicerato, que es un compuesto intermedio en el metabolismo de los carbohidratos. Este camino serina-glicina-C₁ se muestra en la Figura 3. El primer paso obligado es la generación de 3-fosfohidroxipiruvato por la acción de fosfoglicerato-deshidrogenasa codificada, por ejemplo, por el gen *serA* de *E. coli*.

CH₂-THF se genera en dos pasos en este camino: el primero es la conversión de L-serina en glicina por la acción de serina-hidroximetiltransferasa codificada, por ejemplo, por el gen *glyA* de *E. coli*. El segundo es la conversión de glicina en dióxido de carbono y amoníaco por el complejo enzimático de escisión de la glicina que es el producto de al menos cuatro genes.

En muchos organismos, puede generarse también CH₂-THF a partir de THF en 3 pasos, utilizando formiato para proporcionar el átomo de carbono, como se muestra en la Figura 4. El formiato puede derivarse del compuesto intermedio metabólico central piruvato. En los organismos eucariotas, las actividades de las tres enzimas requeridas pueden estar presentes en una sola proteína trifuncional, como la codificada por ejemplo por el gen *ADE3* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Modificaciones génicas de DNA cromosómico o extra-cromosómico en organismos productores de timidina que promueven la disponibilidad de CH₂-THF han conducido a la producción de timidina con rendimiento satisfactorio y con niveles significativamente reducidos de UdR. Las modificaciones génicas de este tipo pueden utilizarse para invertir un aumento en UdR que puede resultar cuando la producción total de PdN se incrementa utilizando manipulaciones genéticas tales como las expuestas en US 5.213.972 y WO 01/02580, permitiendo así una mejora en el rendimiento del proceso sin un aumento inaceptable en la impureza UdR.

El organismo es una bacteria, más preferiblemente *E. coli*. Sin embargo, *Brevibacterium* y especies de *Bacillus*, como se expone en los documentos de la técnica anterior identificados previamente, y otros organismos productores de timidina, v.g., la bacteria *Corynebacterium* o levadura podrían seleccionarse y modificarse de acuerdo con la invención descrita. Se apreciará que existen diversos modos por los cuales puede aumentarse la disponibilidad de CH₂-THF en un organismo productor de timidina, y que el más eficaz dependerá en cada caso de los entorno genético de dicho organismo.

El organismo comprende una unidad de transcripción (que puede ser cromosómica o extra-cromosómica) capaz de sobreexpresar una timidilato-sintasa codificada por un gen *td* o *thyA*, y uno o más genes causantes de la producción de timidina a partir de dTMP, tales como, por ejemplo, una desoxitimidilato-fosfohidrolasa codificada, por ejemplo, por un gen de dTMPasa.

El organismo incluye un gen que, cuando se expresa, facilita la conversión de DHF en THF, el gen *frd* del bacteriófago T4.

El gen T4 *frd* de la dihidrofolato-reductasa puede introducirse directamente en el DNA cromosómico del organismo o incorporarse en un constructo de DNA que puede ser hospedado a su vez por el organismo. Preferiblemente, el constructo de DNA es un vector, tal como un plásmido, un virus, transposón, o mini-cromosoma.

Cuando se utiliza un constructo de DNA para introducir el DNA en una célula hospedadora, es preferible asegurarse de que el mismo está diseñado para mantenerse establemente en su hospedador propuesto.

5 En una realización y modo óptimo particularmente preferidos, el organismo es la cepa hospedadora de *E. coli* CMG2576, derivada de la cepa DCG2451 dada a conocer en WO 01/02580, que alberga el plásmido pCG609, derivado de pCG532 dado a conocer en WO 01/02580. Detalles más completos de su preparación se dan en los Ejemplos 3 y 4. Esta combinación ha sido estabilizada doblemente para asegurarse de que el plásmido se mantiene en la cepa hospedadora durante el crecimiento en condiciones "no inductoras".

10 El gen de TMPasa se inserta en el cromosoma hospedador, acoplado con un promotor P_L del bacteriófago lambda. El plásmido lleva un represor sensible a la temperatura cl₈₅₇ del bacteriófago lambda bajo control de su propio promotor, relocalizado desde el cromosoma en las cepas hospedadoras dadas a conocer en WO 01/2580. Si el plásmido se pierde no hay producción alguna del represor, y el gen de TMPasa se expresa de tal manera que TMP se convierte en timidina y el organismo muere.

15 Los Solicitantes establecieron que este mecanismo de estabilización era insuficiente para uso en cultivos en gran escala con las muchas generaciones de crecimiento requeridas, dado que la pérdida de plásmido acompañada por la desactivación simultánea del gen de TMPasa localizado cromosómicamente es un evento suficientemente frecuente para permitir el crecimiento de derivados exentos de plásmido. Se añadió un segundo mecanismo de estabilización, en el que un gen esencial para el crecimiento y la supervivencia se delecionó del cromosoma y se relocalizó en el plásmido. En la combinación CMG2576 y pCG609 este gen es *ThyA*, clonado en el plásmido bajo control de un promotor *lac*.

20 Sin un gen *ThyA* funcional, la célula no puede fabricar TMP, por lo que no puede producir TTP para la síntesis de DNA y muere. Este mecanismo es particularmente eficaz, dado que los genes pueden mutar fácilmente para perder una función, pero con facilidad mucho menor recrean uno que se haya perdido por completo. Además, el producto de la enzima que falta es un compuesto fosforilado que es incapaz de "alimentación cruzada" por salida de las células funcionales y entrada en aquéllas que han perdido el gen llevado por el plásmido.

25 Para demostrar los aspectos más generales de la invención, se describen en la descripción detallada ejemplos adicionales, no siempre directamente comparables. Los datos del test en matraces de sacudidas incluyen a menudo la introducción de un "gen de test" en un segundo plásmido. Sin embargo, tales sistemas multi-plásmido no han sido sometidos a ensayos a escala y no ha sido establecida su estabilidad genética en cultivo en gran escala.

30 En esta memoria se da a conocer un método de producción de timidina que comprende dejar crecer un organismo en un medio de cultivo, comprendiendo el organismo una o más modificaciones genéticas de su DNA, o DNA extra-cromosómico necesario para su crecimiento, caracterizado porque el organismo comprende una o más modificaciones genéticas que dan como resultado el camino biosintético de la timidina produciendo preferentemente TdR a expensas de UdR como consecuencia de una o más modificaciones genéticas que aumentan la disponibilidad de unidades de un solo carbono para conversión de dUMP en dTMP.

35 Preferiblemente, el contenido de UdR es menor que 5% del contenido de timidina.

Preferiblemente, el contenido de timidina, por la vía de productividad específica, es mayor que 5 mg de TdR/litro/hora/g de peso de células secas, más preferiblemente mayor que 7,5 a 10 en pasos de 2,5 a 25 mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas y mayor.

40 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un medio de cultivo capaz de soportar el crecimiento y la producción de timidina para un organismo de la invención.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona zidovudina producida a partir de timidina obtenida de acuerdo con el método de la invención.

Realizaciones Preferidas de la Invención

45 En una primera y preferida realización, se introduce un gen en el organismo indirectamente como DNA extra-cromosómico, muy preferiblemente en la forma de un plásmido (en lugar de directamente en el cromosoma). El gen preferido es uno que expresa una enzima que es capaz de asegurar que una enzima timidilato-sintasa (EC 2.1.1.45), que convierte desoxiuridina-monofosfato (dUMP) en timidina-monofosfato (dTMP), se produce con un suministro fácil de grupos metilo tales que la mayor parte de dUMP se metila a dTMP en lugar de convertirse en 2'-desoxiuridina (UdR).

50 En esta realización preferida, el gen preferido es uno que facilita la conversión de dihidrofolato (DHF) en tetrahidrofolato (THF), un gen que codifica dihidrofolato-reductasa, el gen *frd* del bacteriófago T4 (T4frd).

Se dan a conocer en esta memoria modificaciones génicas realizadas para favorecer la conversión de THF en 5,10-metilenotetrahidrofolato (CH₂-THF). La totalidad de estas modificaciones genéticas tienen el objetivo común de forzar la conversión de dUMP en dTMP con preferencia a UdR.

5 Modificaciones génicas que se ha demostrado funcionan sea como alternativa a la modificación preferida o en combinación con ella incluyen las siguientes:

- 10 • Realización de una modificación en una enzima que realiza directamente la conversión de THF en CH₂-THF. Una modificación de este tipo es la introducción de un gen que expresa la enzima serina-hidroximetiltransferasa, que convierte L-serina en glicina y cataliza al mismo tiempo la conversión de THF en CH₂-THF, por ejemplo, *glyA* de *E. coli*. Modificaciones adicionales de este tipo podrían incluir la introducción de un gen o genes que expresan uno o más componentes del complejo enzimático de escisión de la glicina que cataliza la conversión de THF en CH₂-THF simultáneamente a la conversión de glicina en dióxido de carbono y amoníaco, por ejemplo los genes *gcvT*, *gcvH*, *gcvP* y *lpd* de *E. coli*.
- 15 • Realización de una modificación génica que efectúa directamente la conversión de THF en CH₂-THF utilizando formiato para proporcionar la unidad de un solo carbono requerida. Una modificación de este tipo es la introducción de un gen o genes que expresan las actividades enzimáticas de formil-THF-sintasa, metenil-THF-ciclohidrolasa y CH₃-THF-deshidrogenasa. Un ejemplo podría ser el gen *ADE3* de levadura, que codifica una proteína trifuncional que exhibe todas estas actividades. Un ejemplo adicional podría ser la introducción en *E. coli* de un gen que codifique precisamente la formil-THF-sintasa, estando ya presentes las otras enzimas requeridas para esta conversión.
- 20 • Realización de una modificación génica que aumenta la disponibilidad de un sustrato para una reacción que efectúa la conversión de THF en CH₂-THF. Un caso de este tipo es la promoción de disponibilidad de L-serina como sustrato para la serina-hidroximetiltransferasa por introducción de un gen tal como *serA* de *E. coli* que expresa 3-fosfoglicerato-deshidrogenasa, que cataliza el primer paso en el camino desde carbohidrato a L-serina. Ejemplos adicionales podrían incluir la introducción de genes que expresan las últimas enzimas implicadas en la generación de L-serina a partir de 3-fosfo-D-glicerato, tales como *serC* y *serB* de *E. coli*, o cualquier modificación génica que aumente la disponibilidad de formiato para el complejo enzimático codificado por el gen *ADE3* de levadura.
- 25

30 Los aspectos respectivos de la presente invención dan lugar a un avance significativo con respecto a la doctrina tanto de US 5.213.972 como de WO 01/02580 y proporcionan constructos de DNA mejorados y células hospedadoras que comprenden los constructos para uso en la producción comercial de timidina. Los mismos pueden aplicarse también a la modificación de otros organismos productores de timidina.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción que sigue. Sin embargo, debe entenderse que éstos representan realizaciones preferidas de la invención y se dan únicamente a modo de ilustración.

35 Los constructos de la presente invención pueden ser cromosómicos o, más preferiblemente, extracromosómicos, v.g., localizados en un vector.

Vectores de la presente invención incluyen plásmidos, virus (con inclusión de fagos), transposones, y minicromosomas, preferiblemente plásmidos.

40 El vector puede introducirse en una célula hospedadora de acuerdo con cualquier método conveniente conocido por los expertos en la técnica, v.g. transducción de P1, electroporación o transformación.

Células hospedadoras adecuadas útiles en la presente invención incluyen procariotas (v.g. bacterias). Los procariotas incluyen cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, y mutantes de los mismos.

45 Los vectores de la presente invención comprenden preferiblemente un elemento regulador (v.g. un promotor tal como lambda P_L, operador, activador, represor tal como represor lambda, particularmente una variante sensible a la temperatura, y/o intensificador), secuencias de terminación apropiadas, secuencias de iniciación y sitios de fijación de ribosoma. El vector puede comprender adicionalmente un marcador seleccionable. Alternativamente, pueden estar localizados elementos reguladores (particularmente el represor lambda) en el cromosoma de la célula hospedadora.

50 Células hospedadoras modificadas de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles en la producción comercial de timidina. En un uso particularmente ventajoso de la presente invención, pueden utilizarse células hospedadoras de *E. coli* que comprenden (albergan o incorporan) un plásmido modificado de acuerdo con la presente invención (particularmente en conjunción con las doctrinas de US 5.213.972 o WO 01/02580) en la

producción comercial de timidina. Así, células hospedadoras modificadas de acuerdo con la presente invención pueden comprender además dTMPasa derivada de v.g. PBS1 y las mutaciones dadas a conocer en US 5.213.972 v.g., *deoA*, *tdk-1* y *udp-1*, junto con las mejoras adicionales al constructo expuestas en WO 01/02580, v.g. T4 nrdCAB, T4 td, dcd y udk.

- 5 Generalmente, se emplea un método de fermentación como el expuesto en WO 01/02580, que implica la inmersión de las células en un medio de cultivo contenido en una vasija adecuada. Después de cultivo en condiciones apropiadas, la timidina producida se recoge y se purifica (enriquece), en caso necesario, hasta el grado farmacéutico de acuerdo con protocolos estándar. La timidina purificada puede utilizarse luego en la producción de medicamentos, v.g., composiciones farmacéuticas tales como AZT.

10 Breve Descripción de los Dibujos

La presente invención se ilustra, exclusivamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras siguientes en las cuales:

Fig. 1 ilustra un camino de biosíntesis de timidina;

Fig. 2 ilustra la reacción de timidilato-sintasa (conversión de dUMP en dTMP);

- 15 Fig. 3 ilustra la regeneración de CH₂-THF a partir de L-serina y glicina;

Fig. 4 ilustra la regeneración de CH₂-THF a partir de formiato;

Fig. 5 resume los métodos para mejorar la regeneración de CH₂-THF;

Fig. 6 ilustra un mapa para el plásmido pCG532 (la doctrina de la técnica anterior);

Fig. 7 ilustra un mapa para el plásmido pCG609;

- 20 Fig. 8 ilustra mapas para el plásmido pCG376; y

Fig. 9 compara la producción de timidina en varios hospedadores/plásmidos.

Descripción Detallada

- La Figura 1 ilustra la complejidad del camino de biosíntesis de la timidina y la genética asociada, utilizando como ejemplo *E. coli* K12 con la adición de un gen de TMPasa. Timidina es TdR y 2'-desoxiuridina es UdR, en el lado inferior derecho del diagrama. UdR difiere químicamente de TdR por la ausencia de un solo grupo metilo. La semejanza estructural entre los compuestos hace difícil y costosa la purificación. La invención concierne en sí misma a la realización de modificaciones génicas que influyen en la formación preferencial de TdR a expensas de la producción de UdR.

- La Solicitante ha establecido que los niveles de TdR con relación a UdR pueden controlarse eficazmente asegurándose de que el paso de proceso de dUMP a dTMP, catalizado por expresión de v.g., timidilato-sintasa a partir de un gen de timidilato-sintasa (v.g. *td*, *thyA* o *thyX*), se facilita con un suministro incrementado de unidades de un solo carbono como v.g. CH₂-THF.

- Esto se consigue fundamentalmente asegurándose de que la molécula donante de un solo carbono producida por la conversión de dUMP en dTMP se recicla rápidamente a su estado activo como CH₂-THF. La Figura 2 muestra dos mecanismos alternativos para la timidilato-sintasa, cada uno de los cuales produce un donante de un solo carbono empobrecido diferente. En el caso en que la timidilato-sintasa es del tipo EC 2.1.1.45, codificado por ejemplo por un gen *thyA* o *td*, el donante empobrecido es DHF. Cuando la enzima es del tipo EC 2.1.1.148, codificado por ejemplo por un gen *thyX*, el donante empobrecido es THF.

- Dado que el precursor directo de CH₂-THF es THF, será evidente que el organismo que utilice la timidilato-sintasa EC 2.1.1.45, por ejemplo *E. coli*, el primer paso tiene que ser la conversión de DHF en THF. Por introducción en un organismo de este tipo de un gen de dihidrofolato-reductasa, codificante de una enzima que cataliza esta conversión, la Solicitante ha logrado reducir significativamente los niveles de UdR contaminante y aumentar adicionalmente la productividad de timidina como se ilustra en el Ejemplo 6.

- Este método permite una mejora adicional de los rendimientos del proceso de fermentación de la timidina de acuerdo con los principios expuestos por US 5.213.972 y/o WO 01/02580. En el caso de que modificaciones genéticas previas para aumentar los desoxirribonucleósidos de pirimidina totales hubieran dado como resultado fundamentalmente niveles incrementados de UdR, por introducción de un gen de dihidrofolato-reductasa, este producto adicional puede dirigirse ahora a TdR como se ilustra por el Ejemplo 7.

En el Ejemplo 8, este método se ha combinado con modificaciones ulteriores para asegurar que un constructo plasmídico portador de la dihidrofolato-reductasa y otros genes clonados requeridos para la producción de TdR se mantiene establemente en su cepa hospedadora *E. coli* apropiada. Esto representa la mejora óptima actual con respecto al proceso de la técnica anterior dado a conocer por WO 01/02580, pero en modo alguno alcanza el límite de lo que puede esperarse de la presente invención.

Será evidente por Fig. 2 que el aumento de la conversión de DHF en THF por la introducción de un gen de dihidrofolato-reductasa es una modificación genética que puede conseguirse para producir el aumento deseado en la regeneración de CH₂-THF en un organismo productor de timidina. Sin embargo, este método no es aplicable a organismos que contienen la timidilato-sintasa del tipo EC 2.1.1.148. En tales casos, como en los casos en que la conversión de DHF en THF no es, o no es ya, el paso limitante en la regeneración de CH₂-THF, existen diversas modificaciones genéticas alternativas o adicionales que pueden aplicarse para conseguir el resultado deseado de producción de TdR con bajos niveles de UdR.

Tales modificaciones alternativas resultarán evidentes por consideración de las rutas por las cuales THF se convierte biológicamente en CH₂-THF, por ejemplo a partir de L-serina y glicina como se muestra en Fig. 3, o a través de formiato como se muestra en Fig. 4. Una diversidad de soluciones posibles se resume en la Fig. 5. En general, modificaciones adecuadas aumentarán la tasa global de síntesis de CH₂-THF o mejorarán la tasa de suministro de unidades de un solo carbono para convertir THF en CH₂-THF.

Las Solicitantes han testado varios ejemplos de estos métodos. En el Ejemplo 9, se sobreexpresa una enzima capaz de convertir THF en CH₂-THF por conversión de L-serina en glicina. En el Ejemplo 10, se sobreexpresa otra enzima con el objetivo de mejorar el suministro de unidades de un solo carbono para conversión de THF en CH₂-THF por aumento del flujo de metabolitos al camino serina/glicina representado en la Figura 3. Los Ejemplos 11 y 12 utilizan diferentes métodos para introducir en *E. coli* un camino no nativo para conversión de THF en CH₂-THF utilizando formiato como donante de un solo carbono.

En cada caso existe, o bien i) una pequeña disminución en el nivel de UdR, ii) un pequeño aumento en TdR sin aumento relativo en UdR, o iii) una combinación de ambos. Comparadas con los efectos de la adición de dihidrofolato-reductasa que se muestran en los Ejemplos 6, 7 y 8, las mejoras son relativamente menores, pero se apreciará que cada una podría ser más significativa en un organismo productor de timidina alternativo o mejorado adicionalmente, y es por tanto un ejemplo válido de la presente invención.

EJEMPLO 1 (Comparativo)

Constructo/Cepa de la Técnica Anterior

Los beneficios de la presente invención se demostrarán utilizando el constructo/cepa de la técnica anterior dado a conocer en WO 01/02580 como comparador. Fig. 6 ilustra el constructo pCG532 y la Tabla 1 proporciona el genotipo de la cepa hospedadora de *E. coli* CMG2451. Sin embargo, se apreciará que no todos los genes expuestos en dicho lugar forman una parte esencial de la presente invención, aunque la presencia de un gen de timidilato-sintasa (td, en el plásmido) y una TMPasa (integrada en el cromosoma) son importantes para la realización preferida de aquélla.

Tabla 1: Genotipo de la Cepa Hospedadora de la Técnica Anterior CMG2451

Cepa	Genotipo
CMG2451	<i>hsdR-2 supE thi deoA-75 tdk-1</i> (λ <i>cl₈₅₇ ΔBAM ΔH1</i>) <i>nic bio Δ(chlD-pgl) nadA-50::Tn10 udp-1</i> <i>chr::Tn5::dTMPasa AZT^R FUdR^R</i>

EJEMPLO 2

Test en Matrices de Sacudidas Para Producción de Timidina

El constructo y la cepa a que se hace referencia en el Ejemplo 1 se dejaron crecer en medio de cultivo (Tabla 2) de acuerdo con la metodología siguiente. Se obtuvieron datos para propósitos comparativos tanto acerca de la tasa de producción de TdR como de la cantidad relativa de impureza de UdR (expresada como porcentaje de TdR).

5 Todos los experimentos se realizaron en matraces de sacudidas de 250 ml provistos de tabique de desviación con 7 a 12 matraces por cepa testada. Se utilizó un cultivo de siembra reciente desarrollado en medio LB para inocular 20 ml de medio por matraz con aproximadamente 2,5% en volumen. Los cultivos se dejaron crecer a 31°C hasta DO 600 nm = 5. La temperatura se cambió luego de 35,7° a 36,8°C cambiando los matraces a una máquina de sacudidas diferente. Se tomaron muestras para análisis a las 4 y 6 horas después de la inducción por temperatura.

Tabla 2: Formulación Enriquecida en Medio de Matraz de Sacudidas

Componente	Cantidad, g/l
Fosfato de potasio, dibásico	8,0
Fosfato de potasio, monobásico	8,0
Sulfato de magnesio, heptahidratado	0,4
Sulfato de amonio	2,0
Citrato de sodio trihidratado	0,5
Amberex 695, Sensient o Hy-Yest 412, Quest	10
Amberferm 4015 AG, Sensient	5-10
Sorbitol	20
Carbonato de calcio	10

10 Se ajustó el medio a pH 7,0 con NaOH antes de tratamiento en autoclave a 121°C durante 25 minutos. Después de enfriamiento, se añadieron biotina (1 mg/l de concentración final), tiamina (10 mg/l) y ácido nicotínico (10 mg/l) junto con antibióticos opcionales en caso necesario, ampicilina (100 mg/l), cloranfenicol (30 mg/l), kanamicina (15 mg/l) y tetraciclina (25 mg/l). Los resultados se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 3: Productividad Específica Media (mg/TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido

Cepa hospedadora	Plásmido	Productividad	% UdR	Comentario
CMG2451	pCG532	8	34,5	Media de 23 Experimentos

15 **EJEMPLO 3**

Desarrollo de la Cepa CMG2576 Hospedadora Mejorada de *E. coli* a partir de CMG2451

20 La cepa hospedadora se modificó por una serie de pasos como se enumeran a continuación en la Tabla 4. Hubo 3 cambios significativos en total, aunque será apreciado que ninguno de éstos forma una parte esencial de la presente invención. En los ejemplos que siguen, las cepas intermedias CMG2549 y CMG2560, así como la cepa final CMG2576 se utilizan para demostrar aspectos de la invención.

La cepa CMG2549 difiere de CMG2451 en que el gen cromosómico *ndk* ha sido silenciado por reemplazamiento con un *ndk::kan* desactivado por inserción. El cambio se realizó para mejorar la producción global de nucleósidos de pirimidina de acuerdo con los principios dados a conocer por US 5.213.972, y es importante para la demostración de la utilidad de la presente invención detallada en el Ejemplo 7.

25 Se construyó CMG2560 por eliminación de un profago lambda del cromosoma, reparando al mismo tiempo las mutaciones causantes de requerimientos para biotina y ácido nicotínico. Este cambio se realizó en presencia de un plásmido que llevaba un represor *cl₈₅₇* lambda sensible a la temperatura, sin el cual el gen de *dTMPasa*, insertado en el cromosoma y expresado por un promotor lambda P_L, sería activo y el organismo podría degradar *dTMP*, ser incapaz de producir DNA y morir.

30 Finalmente, CNG2576 difiere de CMG2560 en que el gen cromosómico *thyA* ha sido reemplazado con un *thyA* 748::Tn10 desactivado por inserción. Este cambio se realizó en presencia de un plásmido que llevaba a la vez un

represor cI875 lambda y un thyA clonado. Sin el gen thyA transportado por el plásmido, el organismo es incapaz de sintetizar dTMP y, con ello, incapaz de producir DNA, y muere.

Las razones para los cambios efectuados a fin de eliminar el represor lambda localizado cromosómicamente y desactivar el gen thyA del hospedador se dan en el Ejemplo 8.

5 Tabla 4 - Derivación de la Cepa Hospedadora CMG2576 Mejorada de *E. coli* a partir de CMG2451

Cepa	Genotipo	Derivación
CMG2451	véase Tabla 1	descrita en detalle en WO 01/02580
CMG2532	NA7623 <i>zff-208::Tn10</i>	<i>zff-208::Tn10</i> de CAG18481 ^b
CMG2533	CMG2451 <i>ndk::kan zff-208::Tn10</i>	<i>ndk::kan zff-208::Tn10</i> de CMG2532
CMG2549	CMG2533 λ Tn10 tet ^S	delección de <i>Tn10</i> de CMG2533 and tet ^S ^c
CMG2560	CMG2549/ pCG195 λ^- nic ⁺ bio ⁺	transducción de P1 CMG2549/pCG195 a nic ⁺ & bio ⁺
CMG2576	CMG2560/pCG596 <i>thyA748::Tn10</i>	<i>thyA748::Tn10</i> de KL742 (CGSC6212 ^d)

^a Se introdujeron mutaciones en cepas de *E. coli* por transducción con el fago P1. Si la mutación tenía un marcador selectivo, se utilizó transducción directa de P1. Si la mutación no tenía un marcador selectivo, se utilizó co-transducción de P1 con la inserción próxima Tn10.

10 ^b Singer *et al. Microbiol. Rev.* **53**:1-24, 1989.

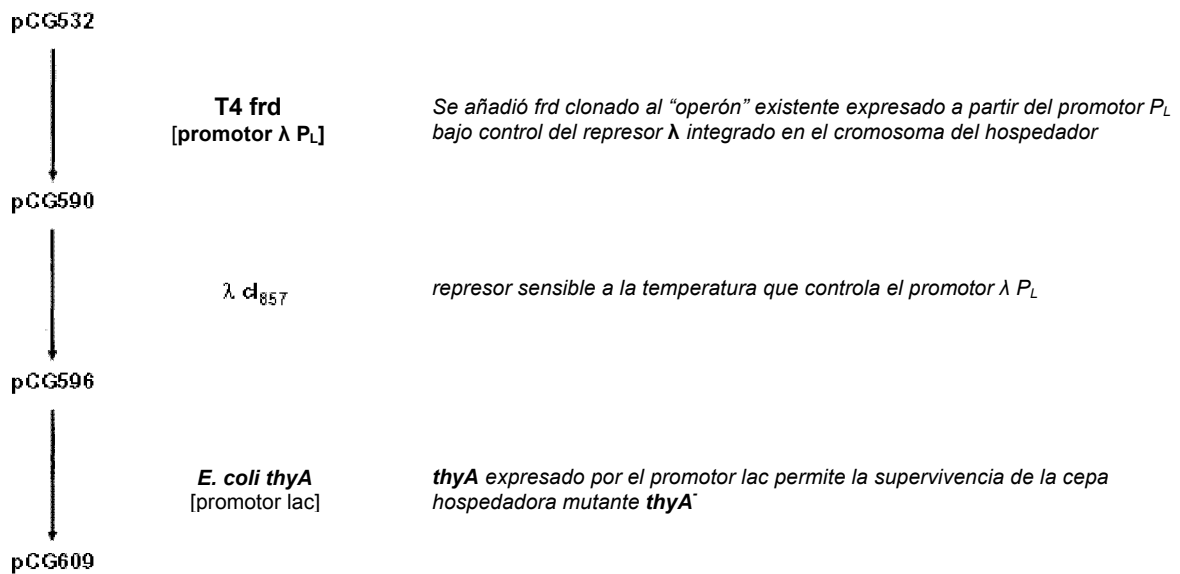
^c La delección de Tn10 se generó por cultivo de la cepa de *E. coli* en medio de clorotetraciclina (Maloy & Nunn *J. Bacteriol.* **145**: 1110-1112, 1981).

^d Todas las cepas CGSC pueden obtenerse de *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, PO. Box 208104, New Haven, CT06520-8104.

15 **EJEMPLO 4**

Desarrollo del Constructo Mejorado, pCG609, a partir de pCG532

El constructo se modificó por una serie de pasos como se reseña a continuación:



Más específicamente, los genes se derivaron como se ilustra en la Tabla 5 a continuación. Los plásmidos pCG532 y pCG609 se ilustran por las Figuras 6 y 7 respectivamente, en las que pueden compararse las características principales.

- 5 De los tres cambios realizados en el constructo únicamente el gen T4 frd forma una parte esencial de una realización de la presente invención. El efecto de esta modificación se ilustra por los Ejemplos 6 y 7 más adelante. Los cambios restantes se hicieron para prevenir la pérdida de plásmido de la cepa hospedadora, como se detalla en el Ejemplo 8 más adelante.

Tabla 5: Desarrollo de pCG609 a partir del Constructo pCG532 de la Técnica Anterior

Plásmido	Genes Añadidos	Derivación
pCG532	El constructo de la técnica anterior incluye: T4 nrdCAB, td, (promotor λ PL)	descrita en detalle en WO 01/02580
pCG590	T4 frd clonado en pCG532	T4 frd subclonado de pCG581 (véase Ejemplo 5)
pCG596	λ cl857 clonado en pCG590	desplazado del cromosoma de la cepa hospedadora
pCG609	thyA clonado en pCG596	thyA nativo de <i>E. coli</i> clonado por PCR

10 EJEMPLO COMPARATIVO 5

Desarrollo de Constructos de Tests a partir de pCG376

- 15 Los efectos de la incorporación de genes adicionales a combinaciones cepa hospedadora/plásmido establecidas se testaron por introducción de éstos en un segundo plásmido. El segundo plásmido está diseñado de modo que sea compatible con pCG532 y sus derivados, a fin de que ambos puedan mantenerse de manera estable en un solo hospedador de *E. coli*. pCG532 se deriva finalmente del plásmido natural ColE1: su historia detallada se da a conocer en WO 01/02580. El segundo plásmido está basado en el vector de clonación pACYC177 (Chang & Cohen, *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156, 1978), que se deriva del plásmido natural p15A y es compatible con ColE1.

- 20 Este sistema presenta la ventaja de que pueden testarse adiciones de genes sin necesidad de modificar adicionalmente los constructos ya complejos descritos en el Ejemplo 4 anterior. Sin embargo, se reconoce que este sistema puede ser inestable sin antibióticos selectivos y por consiguiente inadecuado para utilización en gran escala en un proceso de fermentación industrial.

- 25 Los genes testados utilizando el segundo plásmido se enumeran en la Tabla 6 junto con referencias que consignan sus secuencias nucleotídicas completas. Todos ellos eran genes bien caracterizados que fueron clonados por PCR según protocolos estándar. Cada uno se expresó a partir de un promotor P_L del bacteriófago lambda de tal modo que podía controlarse con el represor cl857 sensible a la temperatura junto con los genes clonados en el primer plásmido y la dTMPasa integrada en el cromosoma del hospedador *E. coli*.

Tabla 6: Desarrollo de Constructos de Test a partir de pCG376

Plásmido	Genes Añadidos	Derivación/Referencia
pCG376		dado a conocer en WO 01/02580
pCG601	glyA de <i>E. coli</i> K12	Plamann <i>et al.</i> , Nucleic Acids Res. 11: 2065-2075, 1983
pCG844	serA de <i>E. coli</i> K12	Tobey & Grant, J. Biol. Chem. 261: 12179-12183, 1986
pCG870	ADE3 de <i>S. cerevisiae</i>	Staben & Rabinowitz, J. Biol. Chem. 261: 4629-4637, 1986
pCG881	fhs de <i>C. acidi-urici</i>	Whitehead & Rabinowitz, J. Bacteriol. 170: 3255-3261, 1988

EJEMPLO COMPARATIVO 6

Efecto de la Adición del Gen T4 frd Clonado a la Cepa Hospedadora/Constructo de la Técnica Anterior

5 pCG590, descrito en el Ejemplo 4, difiere del constructo pCG532 de la técnica anterior únicamente en la adición del gen frd del bacteriófago T4, que codifica T4-dihidrofolato-reductasa. La enzima T4 está bien caracterizada y se expresa fácilmente en *E. coli* (Purohit *et al. J. Biol. Chem.* **256**: 9121-9125, 1981).

Este gen se añadió al "operón" expresado por el promotor P_L de lambda y es inducido por tanto con dTMPasa (en el cromosoma) y los genes de T4 nrdC, nrdA, nrdB y td (en el plásmido) cuando la temperatura se incrementa y se desactiva el represor cl₈₅₇ lambda.

10 Utilizando el método descrito en el Ejemplo 2, se obtuvieron datos en matraces de sacudidas para la cepa hospedadora CMG2451 de la técnica anterior que albergaba el plásmido pCG590, y el resultado se comparó con los obtenidos en el Ejemplo 2 con el mismo hospedador y el plásmido pCG532 de la técnica anterior. Los resultados se dan a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: Productividad Específica Media en Matraces de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con y sin el gen T4 frd expresado

Cepa hospedadora	Plásmido	Productividad Específica	% UdR	Comentario
CMG2451	pCG532	8,92	34,5	datos del Ejemplo 1, media de 23 experimentos
	pCG590	9,43	7,02	590 = 532+T4 frd gene media de 4 experiments

15 Resulta evidente que la adición del gen T4 frd reduce notablemente el nivel de UdR producida, simplificando con ello la producción de TdR sustancialmente pura por fermentación. Se espera que la conversión mejorada de dUMP en dTMP en lugar de UdR debería dar como resultado timidina adicional así como UdR reducida, lo cual parece ser cierto en este caso.

20 **EJEMPLO 7**

Efecto de la Adición del Gen T4 frd Clonado a la Cepa Hospedadora Mutante ndk

25 La cepa hospedadora CMG2549, descrita en el Ejemplo 3, difiere de la cepa hospedadora de la técnica anterior CMG2451 por una mutación en el gen *ndk*, que codifica la nucleósido-difosfato-quinasa. Se ha comunicado que la mutación de este gen aumenta las agrupaciones intracelulares de dCTP y dTTP en *E. coli* (Lu *et al. J. Mol. Biol.*, **254**: 337-341, 1995). De acuerdo con los principios expuestos en US 5.213.972, la introducción de una mutación de este tipo en el camino de biosíntesis de los desoxirribonucleósidos de pirimidina puede utilizarse para aumentar la síntesis global de TdR y UdR en un organismo modificado por ingeniería genética adecuadamente.

30 Utilizando el método del Ejemplo 2, se obtuvieron datos en matraces de sacudidas para las dos cepas hospedadoras CMG2451 y CMG2549, cada una en combinación con pCG532 o pCG590. De este modo se compararon los efectos de la mutación *ndk* y la adición de T4 frd tanto independientemente como en combinación. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8: Productividad Específica Media en Matracas de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con o sin la mutación *ndk* y Con o Sin T4 frd Clonado.

Cepa hospedadora	Plásmido	Productividad Específica	% UdR	Comentario
CMG2451 (<i>ndk</i> +)	pCG532	6,01	38,1	Cada resultado es la media de nueve réplicas en matracas de sacudidas
	pCG590 (T4frd)	6,67	10,2	
CMG2549 (<i>ndk</i> -)	pCG532	11,44	36,7	Se muestran los resultados a las nueve horas debido a que no pudo medirse cantidad detectable alguna de UdR para los constructos pCG590 a las 6 horas (las productividades específicas son menores a las 12 horas que a las 6 horas)
	pCG590 (T4frd)	19,64	1,48	

5 Sorprendentemente, la adición de T4 frd resulta aún más eficaz en la reducción de los niveles de UdR cuando se introduce en un hospedador de *E. coli* que lleva una mutación *ndk*.

10 Aunque la mutación *ndk* aumenta claramente la capacidad de síntesis de desoxirribonucleósidos de una cepa *E. coli* de acuerdo con la técnica anterior, el contenido de UdR es demasiado alto para que una mejora de este tipo pueda aprovecharse en la producción eficaz en costes de timidina pura. Por proporcionar un suministro adecuado de CH₂-THF de acuerdo con la presente invención, la dUMP adicional producida por el mutante *ndk* puede dirigirse hacia dTMP y convertirse por tanto en timidina, en lugar de convertirse en UdR. Los resultados es una mejora muy sustancial con respecto a la técnica anterior en términos tanto de productividad de timidina como de contenido bajo de UdR.

EJEMPLO 8

Efecto de la Estabilización del Plásmido sobre la Producción de Timidina

15 Cuando el pCG590 se testó en la cepa hospedadora CMG2451 o su derivado mutante *ndk* CMG2549, los Solicitantes observaron la pérdida de plásmido a medida que se cultivaba la cepa de *E. coli* resultante. Esta inestabilidad aparente se abordó primeramente por relocalización del represor *cl₈₅₇* del fago lambda sensible a la temperatura desde el cromosoma (en la cepa hospedadora CMG2451 y sus precursores) al plásmido (en el constructo pCG596 y sus derivados).

20 A temperaturas de 31°C e inferiores, el represor *cl₈₅₇* actúa para prevenir la expresión del gen de dTMPasa integrado en el cromosoma, que se clonó con un promotor P_L lambda. Cuando el represor está localizado en el plásmido, la pérdida de dicho plásmido da como resultado la expresión de dTMPasa y la degradación consiguiente de dTMP, lo que conduce a la pérdida de viabilidad para la célula exenta de plásmido. Utilizando este principio, se construyó pCG596 como se describe en el Ejemplo 4 y su cepa hospedadora CMG2560 como en el Ejemplo 3. Cuando la cepa resultante CMG2560/pCG596 se testó de acuerdo con el protocolo de matracas de sacudidas del Ejemplo 2, se observó un pequeño aumento en la tasa de síntesis de timidina con relación a la cepa CMG2451/pCG590, como se muestra en la Tabla 9.

30 Sin embargo, los Solicitantes determinaron que este mecanismo no era completamente eficaz en la prevención de la pérdida de plásmido. Se descubrió que la pérdida de plásmido con mutación simultánea para desactivar el gen de dTMPasa daba como resultado la selección de células viables exentas de plásmido. Se requería un mecanismo adicional o alternativo para asegurar la herencia estable del plásmido.

35 Se añadió a pCG596 el gen *thyA* de *E. coli*, expresado por un promotor *lac*, para formar pCG609. El gen *thyA* cromosómico pudo deleccionarse luego en una cepa hospedadora que albergaba este plásmido. La expresión de timidilato-sintasa por *thyA* es esencial para crecimiento y supervivencia debido a que no existe ningún otro medio por el cual la célula pueda sintetizar dTMP. dTMP no puede atravesar por sí mismo las paredes celulares y "alimentar cruzadamente" con plásmido de las células *thyA*⁺ a las células *thyA* que han perdido el plásmido. Un mecanismo de este tipo, que utiliza un gen esencial y un metabolito que no permite alimentación cruzada, es particularmente eficaz dado que los genes pueden mutar fácilmente para desactivar una actividad enzimática, pero recrean con mucho menor facilidad una actividad que se ha perdido.

40 La construcción de pCG609 se describe en el Ejemplo 4 y la de la cepa hospedadora CMG2576 *thyA*⁺ en el Ejemplo 3. La combinación resultante, cepa CMG2576/pCG609, se testó de acuerdo con el protocolo de fermentación en

matraces de sacudidas del Ejemplo 2, y se observó un pequeño aumento adicional en la tasa de producción de timidina con relación a CMG2560/pCG596, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Productividad Específica Media en Matraces de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con y sin estabilización genética del plásmido

Cepa Hospedadora	Plásmido	Productividad Específica	Comentario
CMG2549	pCG590	25,8	Cada resultado es la media de tests replicados múltiples en matraces de sacudidas, cada uno de 6-8 matraces. Se muestran los resultados a las 4-6 horas
CMG2560 (λ)	pCG596 (λ cl ₈₅₇)	29,7	
CMG2576 (λ , thyA)	pCG609 (λ cl ₈₅₇ , thyA)	31,8	

5

Estos resultados se comparan en la Figura 9 con la cepa CMG2451/pCG532 de la técnica anterior y su derivado mutante *ndk*. Puede verse que los beneficios de la presente invención en cuanto a proporcionar timidina con niveles bajos de UdR se incrementan por mejora de los rendimientos de timidina cuando se proporciona material genético adicional en una forma que se mantendrá establemente cuando se cultiva el organismo.

10 EJEMPLO COMPARATIVO 9

Efecto de la Adición del Gen *glyA* Clonado

Este ejemplo ilustra el efecto de la adición al constructo y la cepa hospedadora de la técnica anterior de un gen *glyA* clonado de *E. coli* que codifica serina-hidroximetiltransferasa. Esta enzima cataliza la conversión de serina en glicina acoplada a la regeneración de CH₂-THF a partir de THF (véase la Figura 3). Se reconocerá que la cepa hospedadora lleva y expresa ya un gen *glyA*, y que el efecto de esta modificación genética es simplemente reforzar el nivel de serina-hidroximetiltransferasa cuando el gen transportado por el plásmido se expresa durante la inducción por temperatura.

El gen *glyA* se clonó en el vector plasmídico pCG376, compatible con pCG532, como se expone en el Ejemplo 5 anterior. El plásmido pCG601 resultante lleva el gen *glyA* con un promotor P_L lambda. Utilizando el test de los matraces de sacudidas descrito en el Ejemplo 2, se comparó CMG2451 que albergaba a la vez pCG632 y pCG601 con CMG2451 de la técnica anterior que albergaba pCG532 solo.

Los resultados se dan en la Tabla 10, y pueden compararse con los resultados dados en el Ejemplo 6 que muestra el efecto de la adición de T4 frd a la cepa hospedadora y el constructo de la técnica anterior. Es evidente que UdR se reduce significativamente por la adición de un gen *glyA* sobreexpresado. Sin embargo, el grado de reducción es menor que el observado para T4 frd, y no se registra aumento significativo alguno en TdR.

Tabla 10: Productividad Específica Media en Matraces de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con y sin el gen *glyA* de *E. coli* sobreexpresado.

Cepa Hospedadora	Plásmidos	Productividad Específica	% UdR	Comentario
CMG2451	pCG532	8,92	34,5	pCG376 es un vector de clonación compatible con pCG532
	pCG532 + pCG601	8,79	22,07	pCG601 = pCG376 + <i>glyA</i>

30

Para el sistema de *E. coli* utilizado para demostrar la presente invención, podría deducirse como conclusión que el suministro de CH₂-THF para conversión de dUMP en dTMP está limitado por la tasa de conversión DHF en THF, en lugar de la de THF en CH₂-THF. Esto explicaría por qué T4 frd es mucho más efectivo en la reducción de UdR que lo es glyA. Sin embargo, cabe esperar que la eficacia relativa de los diferentes métodos para conseguir el objetivo de la presente invención, es decir un aumento en el suministro de CH₂-THF disponible para timidilato-quinasa, sea fuertemente dependiente del entorno genético del organismo productor de timidina al que se aplica esta invención.

Se apreciará que el paso limitante de la velocidad en la síntesis de CH₂-THF puede encontrarse en cualquier otro lugar en las cepas de *E. coli* con genes y mutaciones añadidos diferentes o adicionales y en otros organismos productores de timidina. De hecho, si el organismo productor de timidina continúa mejorándose de acuerdo con los principios expuestos en US 5.213.972 y WO 01/02580, entonces el paso limitante de la velocidad puede desplazarse a la reacción de la serina-hidroximetiltransferasa y la adición de un gen glyA clonado puede exhibir un beneficio más espectacular en la reducción del nivel de UdR en la timidina de acuerdo con los principios de la presente invención.

EJEMPLO COMPARATIVO 10

Efecto de la Adición del Gen serA Clonado

Este ejemplo ilustra el efecto de la mejora en la regeneración de CH₂-THF a partir de THF por aumento de la expresión de una enzima en el camino serina-glicina (Figura 3). 3-Fosfoglicerato-deshidrogenasa es la enzima que cataliza el primer paso en este camino, que es la fuente principal de CH₂-THF en muchos organismos con inclusión de *E. coli*. CH₂-THF se genera en dos reacciones consecutivas: conversión de L-serina en glicina, catalizada por serina-hidroximetiltransferasa, y conversión de glicina en dióxido de carbono y agua, catalizada por el complejo enzimático de escisión de la glicina.

Se añadió un gen serA de *E. coli* clonado para aumentar el nivel de la 3-fosfoglicerato-deshidrogenasa nativa, utilizando el sistema de test del segundo plásmido como se detalla en el Ejemplo 5. El punto de partida para esta nueva modificación genética era la cepa hospedadora óptima y el constructo CMG2576/pCG609 que incluía la mutación *ndk*, el gen T4 frd y el constructo estabilizado genéticamente. Se pensaba que el beneficio del aumento de la capacidad para la síntesis de CH₂-THF a partir de THF podría testarse óptimamente en este entorno, en el que la capacidad para conversión de DHF en THF se había incrementado.

Se clonó el gen serA en el vector plasmídico pCG376, como se expone en el Ejemplo 5. El plásmido pCG844 resultante lleva el gen serA con un promotor P_L lambda. Utilizando el test de los matraces de sacudidas descrito en el Ejemplo 2, se compararon derivados de CMG2576, que albergaban pCG609 combinado con pCG376 o pCG844. Los resultados se dan en la Tabla 11.

No se registraba cambio aparente alguno en la ratio ya muy baja de UdR a TdR, sino sólo un ligero aumento en la tasa de producción de TdR. Comparada con el efecto del gen T4 frd ilustrado por el Ejemplo 6, esta mejora es relativamente pequeña. Sin embargo, se apreciará que el efecto de la adición del gen serA sobreexpresado podría ser más espectacular en un organismo con un entorno genético diferente productor de niveles más altos de UdR.

Se sabe que la acumulación de L-serina inhibe la 3-fosfoglicerato-deshidrogenasa. No obstante, en el ejemplo presente no se cree que sea éste el caso. Sin embargo, en caso de que ocurriera esto, sería preferible modificar el gen serA clonado, dado que un solo cambio en la secuencia de aminoácidos (asn³⁴⁶ a ala) anula la inhibición (Al-Rabee *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 23235, 1997).

Tabla 11. Productividad Específica Media en Matraces de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con y sin el gen serA de *E. coli* sobreexpresado.

Cepa Hospedadora	Plásmidos	Productividad Específica	% UdR	Comentario
CMG2576	pCG609 + pCG376	26,9	1,46	pCG376 es un vector de clonación compatible con pCG532
	pCG609 + pCG844	31,7	1,40	pCG844 = pCG376 + serA

EJEMPLO COMPARATIVO 11**Efecto de la Adición del Gen ADE3 de Levadura Clonado**

Este ejemplo ilustra el efecto de la adición a un organismo productor de timidina de un camino adicional que facilita la regeneración de CH₂-THF. En el sistema de *E. coli* seleccionado para ilustrar la invención, la regeneración de CH₂-THF utilizando formiato como la fuente de la unidad de un solo carbono requerida no es una ruta metabólica normal. Sin embargo, este mecanismo existe en los procariotas, con inclusión de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en el que un solo gen puede codificar la proteína trifuncional que expresa las actividades de las tres enzimas requeridas para convertir THF en CH₂-THF por esta ruta (véase la Figura 4).

Los Solicitantes testaron el efecto de la adición del gen ADE3 de levadura, que codifica esta proteína trifuncional, a su combinación de una cepa hospedadora de *E. coli* mutante *ndk* con un constructo genéticamente estabilizado que incluía T4 frd. Se clonó ADE3, con un promotor P_L lambda, en pCG376 como se describe en el Ejemplo 5, generando el constructo pCG870.

En un test de fermentación en matraces de sacudidas que utilizaba el protocolo del Ejemplo 2, se compararon derivados de CMG2576 que albergaban o bien pCG609 solo o a la vez pCG609 y pCG870. Se incluyó también en el test CGM2576 que albergaba a la vez pCG609 y el vector pCG376 para controlar el efecto del segundo plásmido. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 12. Aunque no se aprecia ningún efecto significativo sobre la productividad de TdR, el contenido de UdR se ha reducido todavía más con respecto a un nivel ya muy bajo. Se apreciará que, aunque el beneficio no es espectacular en el entorno genético de este ejemplo, puede mejorarse en cepas de *E. coli* con genes añadidos diferentes o adicionales y mutaciones, o de hecho en otros organismos productores de timidina.

Se reconocerá además que el formiato no es la fuente normal de unidades de un solo carbono para CH₂-THF en un organismo procarionta tal como *E. coli*, por lo que este aspecto de la invención puede requerir manipulación genética adicional a fin de lograr su efecto máximo. Por ejemplo, la enzima piruvato-formiato-liasas que genera formiato a partir de piruvato podría sobreexpresarse para aumentar la disponibilidad de formiato para la metilación de THF (véase la Figura 5).

Tabla 12. Productividad Específica Media en Matraces de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con y sin el gen de levadura ADE3 expresado.

Cepa hospedadora	Plásmidos	Productividad Específica	% UdR	Comentarios
CMG2576	pCG609	27,2	1,22	resultados a las 4-6 horas pCG376 es un vector de clonación compatible con pCG609
	pCG609+ pCG376	29,9	1,28	
	pCG609+ pCG870	27,2	0,71	pCG870 = pCG376 + ADE3

EJEMPLO COMPARATIVO 12**Efecto de la Adición del Gen fhs de *Clostridium acidi-urici* Clonado**

Este ejemplo ilustra un mecanismo alternativo para introducir en *E. coli* un camino para regenerar CH₂-THF utilizando formiato. Como se muestra en la Figura 4, se requieren tres enzimas para catalizar esta reacción. *E. coli* es incapaz de utilizar este camino dado que carece de la primera de estas enzimas, formiltetrahidrofolato-sintetasa (EC 6.3.4.3). Las dos enzimas restantes están presentes como una proteína bifuncional codificada por el gen fold.

Como alternativa al gen ADE3 de levadura que codifica las actividades de las tres enzimas, los Solicitantes introdujeron en una cepa de *E. coli* productora de timidina el gen *fhs* de *C. acidi-urici*, que codifica únicamente la formiltetrahidrofolato-sintetasa, completando el conjunto de enzimas requerido para el camino del formiato. Como en

el caso de ADE3, este cambio genético se testó en la combinación óptima de la cepa hospedadora CMG2576 y el constructo pCG609 utilizando un segundo vector de plásmido.

5 Se clonó fhs, con un promotor P_L lambda, en pCG376 como se describe en el Ejemplo 5, generando el constructo pCG881. En el test de fermentación en matraces de sacudidas utilizando el protocolo del Ejemplo 2, se compararon derivados de CMG2576 que albergaban pCG609 junto con pCG881 o pCG376. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 13.

10 En contraste con el ejemplo de ADE3 anterior, no se registraba reducción alguna en el nivel ya bajo de UdR en esta cepa y constructo óptimo. Sin embargo, había un ligero aumento evidente en la productividad de TdR. Como en el Ejemplo anterior, se apreciará que éste es un aspecto de la presente invención que puede lograrse mejor en organismos productores de timidina con entorno genético diferente, o en combinación con otros cambios que afecten a la disponibilidad de formiato para conversión de THF en CH₂-THF.

Tabla 13. Productividad Específica Media en Matraces de Sacudidas (mg TdR/litro/hora/g de peso de células secas) para cepas en medio enriquecido con y sin el gen fhs de *Clostridium acidi-urici* expresado.

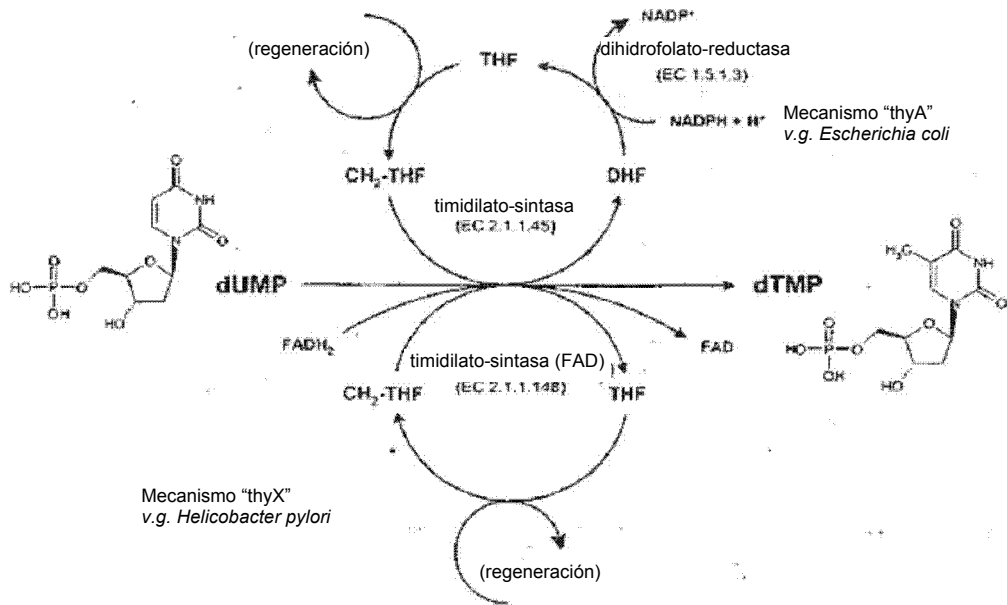
Cepa hospedadora	Plásmidos	Productividad Específica	% UdR	Comentarios
CMG2576	pCG609 + pCG376	19,3	0,294	resultados a las doce horas, media de tres experimentos. pCG881 = pCG376 + fhs
	pCG609 + pCG881	23,7	0,361	

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria capaz de producir timidina cuando se desarrolla en un medio de cultivo, en el cual la cepa hospedadora tiene un gen de TMPasa y un gen de timidilato-sintasa, caracterizada porque la bacteria comprende modificaciones genéticas que dan como resultado que el camino biosintético de la timidina produzca preferentemente TdR a expensas de UdR por aumento de la disponibilidad de una unidad de un solo carbono para dUMP con objeto de su conversión en dTMP, en donde las modificaciones genéticas comprenden la sobreexpresión de un gen *thyA* de *E. coli* o un gen *td* del bacteriófago T4 e incluye una unidad de transcripción T4 *frd* capaz de expresar una dihidrofolato-reductasa (EC 1.5.1.3), y en la que el gen que codifica una nucleósido-difosfato-quinasa (EC 2.7.4.6) ha sido silenciado o desactivado o escindido de algún otro modo.

10

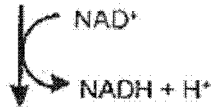
Figura 2: Reacciones de la Timidilato-sintasa



dUMP	ácido desoxiuridílico
dTMP	ácido timidílico
CH ₂ -THF	5,10-metilenotetrahidrofolato
THF	tetrahidrofolato
DHF	dihidrofolato
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleótido
FADH ₂	flavina-adenina-dinucleótido reducido
FAD	flavina-adenina-dinucleótido

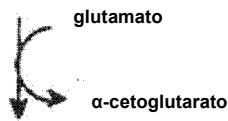
Figura 3: Regeneración de CH₂ a partir de Serina y Glicina

3-fosfo-D-glicerato



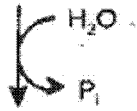
3-fosfoglicerato-deshidrogenasa
gen serA de *E.coli*

3-fosfohidroxipiruvato



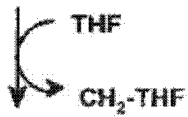
fosfoserina-transaminasa
gen serC de *E.coli*

3-fosfo-L-serina



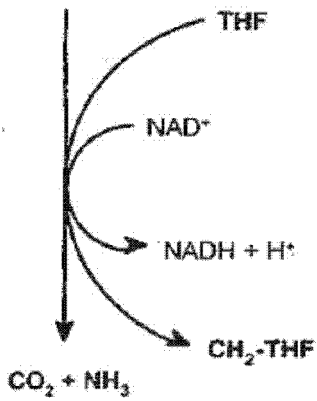
fosfoserina-fosfatasa
gen serB de *E.coli*

L-serina



serina-hidroximetiltransferasa
gen glyA de *E.coli*

glicina



complejo enzimático de escisión de glicina
genes gcvT, gcvH, gcvP y lpd de *E.coli*

Figura 4: Regeneración de CH₂ a partir de Formiato

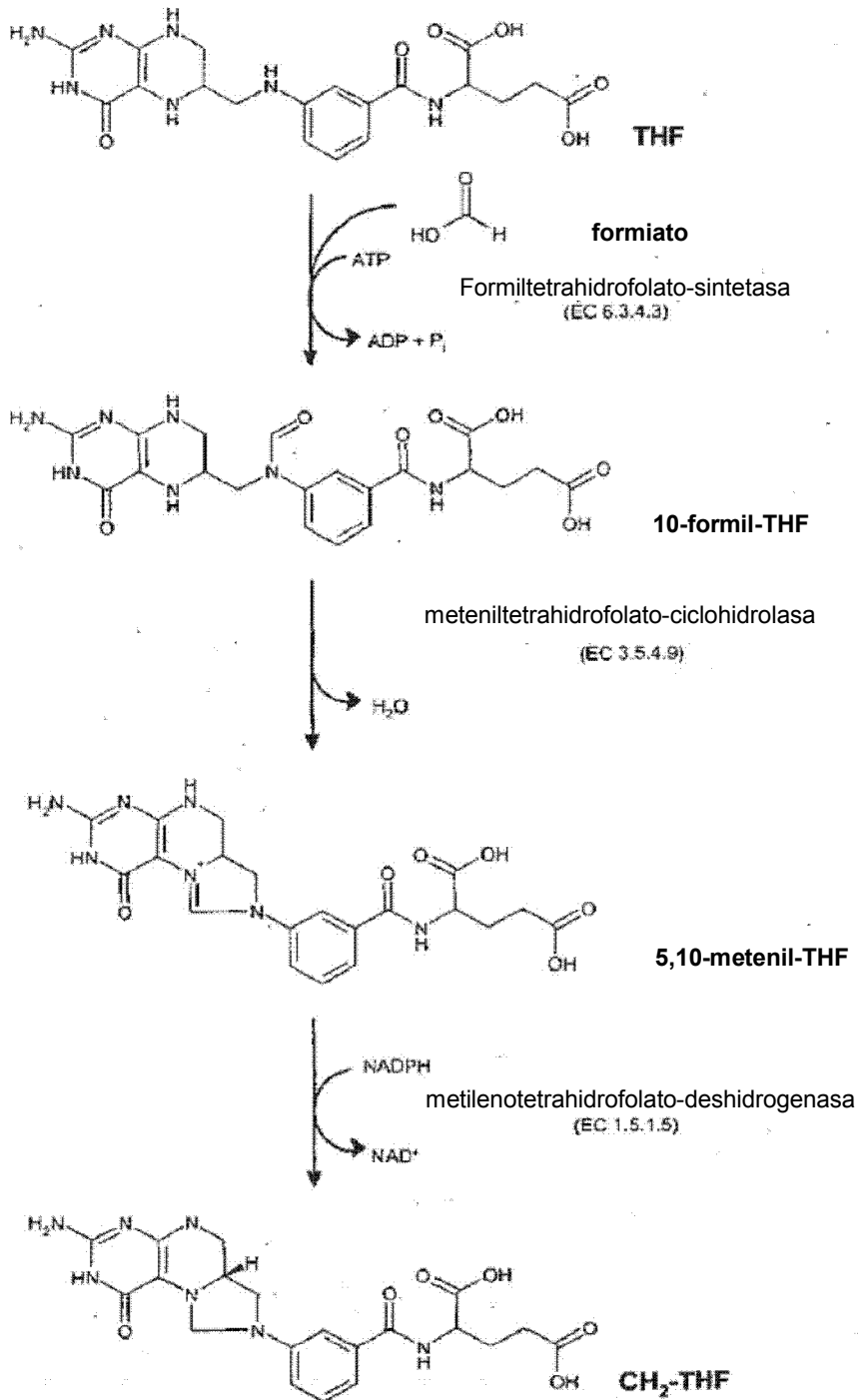


Figura 5: Dianas Genéticas para Mejorar de Regeneración de CH₂-THF

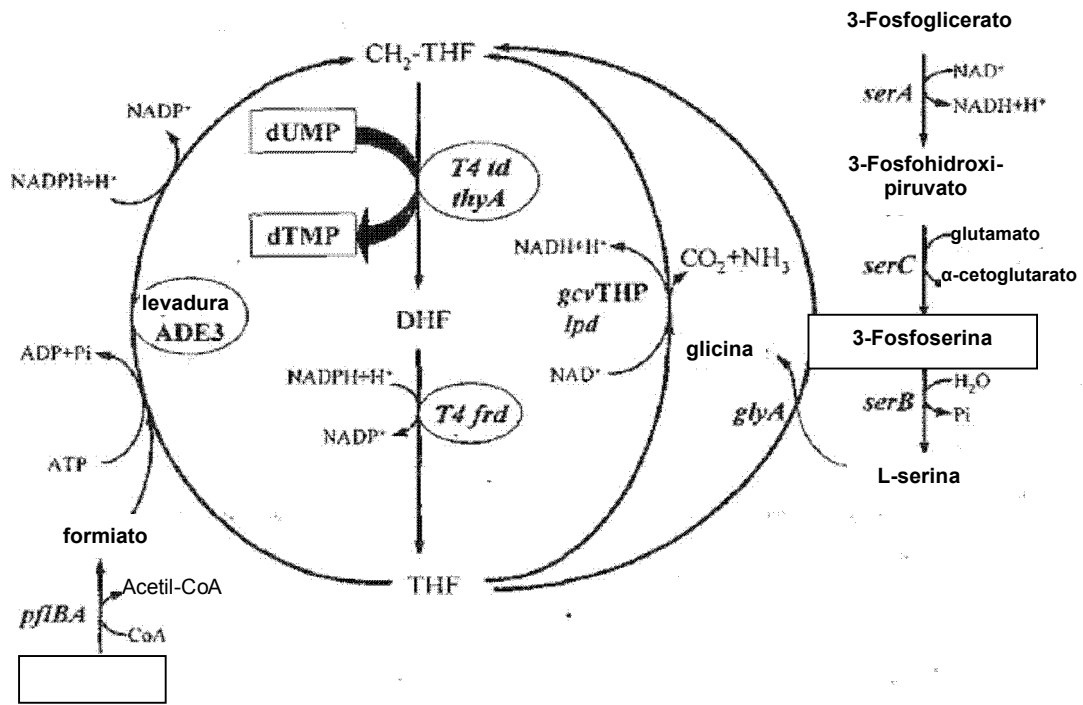


Figura 6: pCG532

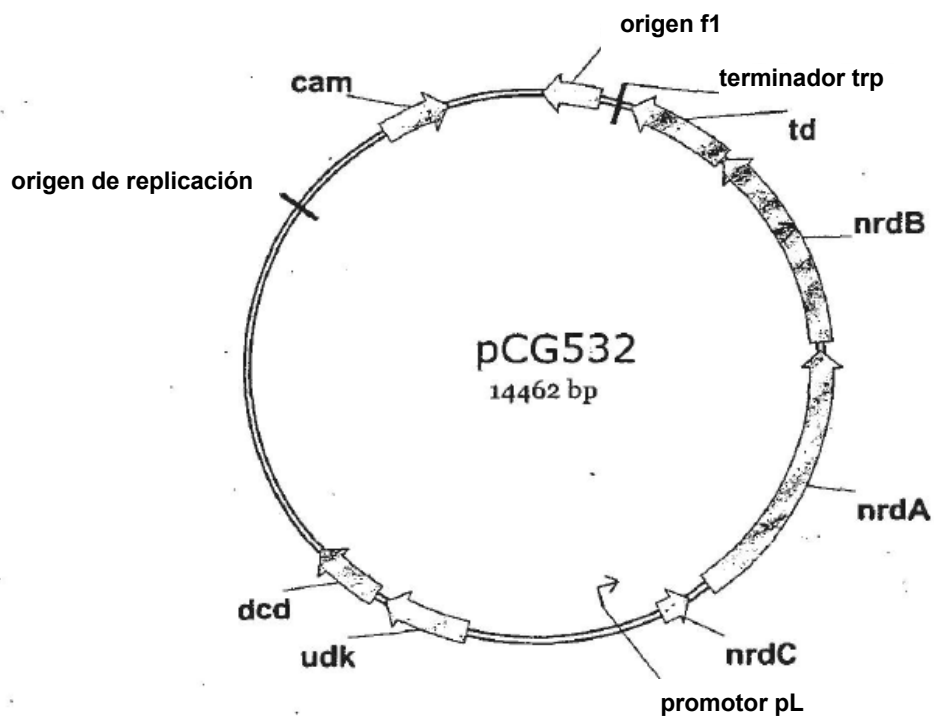


Figura 7: pCG609

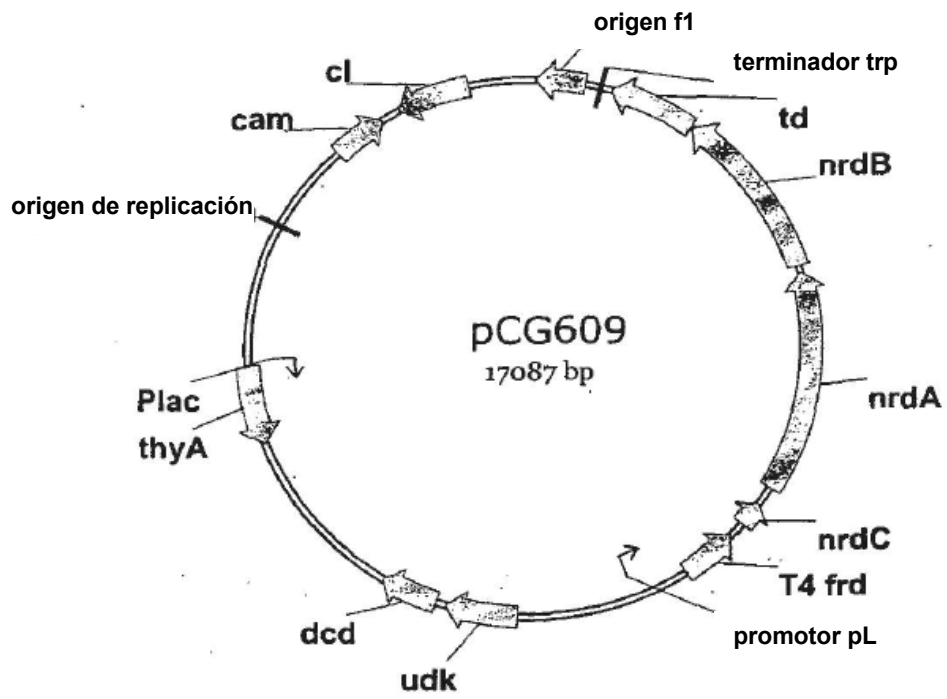


Figura 8: pCG376

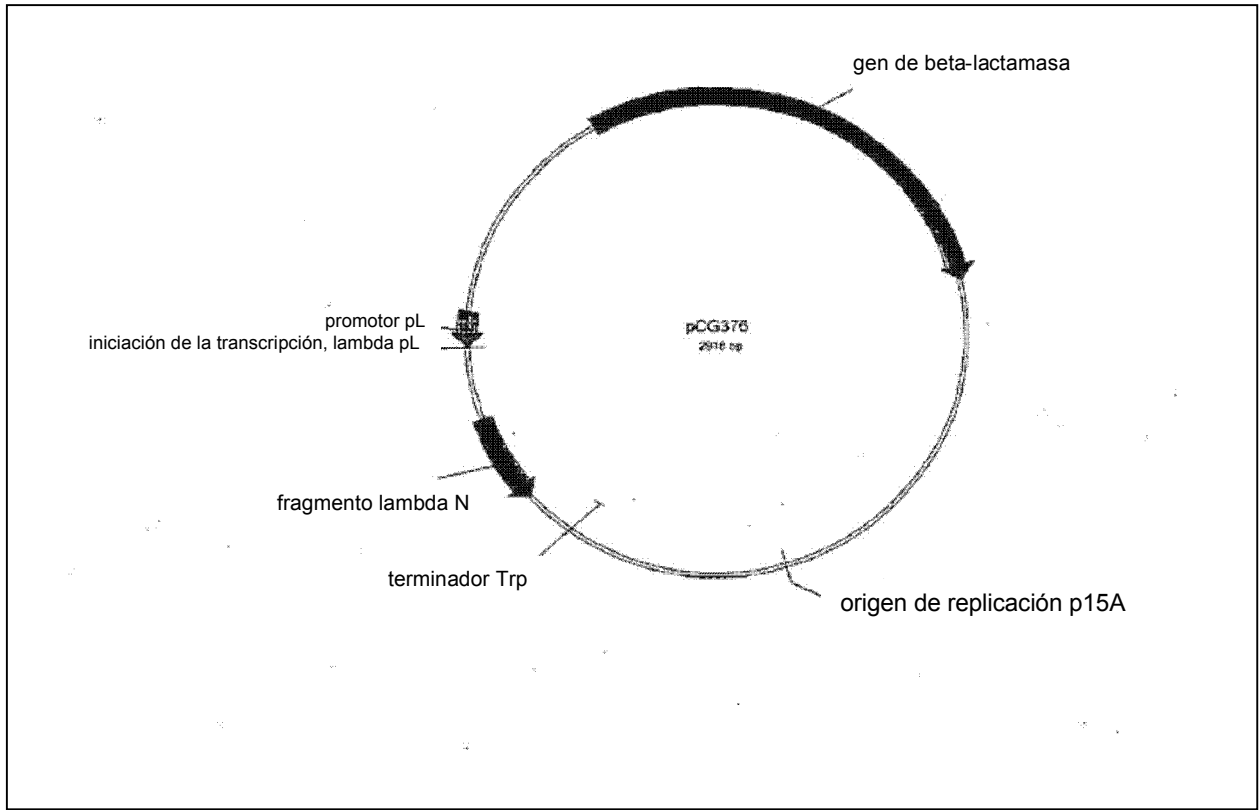


Figura 9: Producción de Timidina en Diversas Cepas/Constructos

Tasa de Producción de Timidina para Cepas/Constructos de E. coli en Matracas de Sacudidas

