



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 188**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07702492 .5**

96 Fecha de presentación : **15.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1987153**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Producción de ácido hialurónico de bajo peso molecular.**

30 Prioridad: **15.02.2006 DK 2006 00218**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2011**

73 Titular/es: **NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es: **Stocks, Stuart, M. y**  
**Brown, Stephen**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 360 188 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producción de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para la producción recombinante de ácido hialurónico (HA o hialuronano) con un peso molecular (PM) promedio bajo en una célula huésped de *Bacillus* mediante fermentación de temperatura controlada. La célula huésped productora de HA se fermenta previamente a una temperatura propicia para su crecimiento y a continuación se cambia a una temperatura más alta favorable para la producción de HA del PM bajo deseado. La temperatura y el pH favorable para la producción de HA de PM bajo puede en alguna situación diferir incluso de las gamas de pH y temperatura consideradas normalmente favorables para el crecimiento del microorganismo que se fermenta.

15 **Antecedentes de la invención**

Los heteropolisacáridos más abundantes del cuerpo son los glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos son polímeros de carbohidratos de cadena recta que consisten en repetir unidades de disacáridos (sólo el queratán sulfato se ramifica en la región de núcleo de los carbohidratos). Las unidades de disacáridos generalmente comprenden, como primera unidad sacárida, uno de los dos azúcares modificados N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc). La segunda unidad es normalmente un ácido urónico, tal como un ácido glucurónico (GlcUA) o iduronato.

Los glicosaminoglicanos son moléculas de carga negativa y tienen una conformación extendida que proporciona una alta viscosidad en solución. Los glicosaminoglicanos se localizan principalmente en la superficie de las células o en la matriz extracelular. Los glicosaminoglicanos también tienen una comprimibilidad baja en solución y, como resultado, son ideales como fluido de lubricación fisiológico, por ejemplo, para las articulaciones. La rigidez de los glicosaminoglicanos proporciona integridad estructural a las células y proporciona vías de paso entre las células, teniendo en cuenta la migración celular. Los glicosaminoglicanos de mayor importancia fisiológica son el hialuronano, el sulfato de condroitina, heparina, heparán sulfato, dermatán sulfato y queratán sulfato. Muchos glicosaminoglicanos enlazan de manera covalente con una proteína del núcleo de proteoglicanos mediante estructuras específicas de oligosacáridos. El hialuronano forma grandes agregados con determinados proteoglicanos, pero es una excepción, ya que las cadenas de carbohidratos libres forman complejos no covalentes con proteoglicanos.

El ácido hialurónico se define aquí como un glicosaminoglicano no sulfatado compuesto mediante la repetición de unidades de disacárido de N-Acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido glucurónico (GlcUA) enlazadas alternando enlaces glicosídicos beta-1,4 y beta-1,3. El ácido hialurónico es también conocido como hialuronano, hialuronato o HA. Los términos hialuronano y ácido hialurónico se usan aquí de forma intercambiable.

Numerosas funciones del hialuronano en el cuerpo han sido identificadas (ver, Laurent T. C. y Fraser J. R. E., 1992, FASEB J. 6: 2397-2404; y Toole B.P., 1991, "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation". en: Cell Biology of the Extracellular Matrix, págs. 305-341, Hay E. D., ed., Plenum, Nueva York). El hialuronano está presente en el cartílago hialino, en el líquido sinovial de las articulaciones y en los tejidos de la piel, tanto dermis como epidermis. Se cree que el hialuronano desarrolla también un papel en numerosas funciones fisiológicas, tales como adhesión, desarrollo, motilidad celular, cáncer, angiogénesis y cicatrización de una herida. Debido a las propiedades biológicas y físicas únicas del hialuronano, se emplea en cirugía ocular y articular, y está siendo probado en otros procedimientos médicos. También se han desarrollado productos de hialuronano para su uso en ortopedia, reumatología, y dermatología.

Las crestas de gallo son una fuente comercial significativa de hialuronano. Los microorganismos son una fuente alternativa. La patente estadounidense n°. 4.801.539 divulga un método de fermentación para preparar ácido hialurónico que incluye una cepa de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3,6 g de ácido hialurónico por litro. La patente europea n°. EP0694616 divulga procesos de fermentación usando una cepa mejorada de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos registrados de aproximadamente 3,5 g de ácido hialurónico por litro.

Los microorganismos usados para la producción de ácido hialurónico por fermentación son cepas de bacterias patógenas, siendo las más importantes entre éstas diferentes *Streptococcus spp.* El grupo A y el grupo C de estreptococos se rodean ellos mismos con una cápsula no antigénica compuesta por hialuronano, que tiene una composición idéntica a la encontrada en el tejido conjuntivo y las articulaciones. *Pasteurella multocida*, otra bacteria que encapsula patógenos, también circunda sus células con hialuronano.

Hialuronano sintasas han sido descritas a partir de vertebrados, patógenos bacterianos y virus de algas (DeAngelis, P. L., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56: 670-682). WO 99/23227 divulga un Grupo I de hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis*. WO 99/51265 y WO 00/27437 describen un Grupo II de hialuronano sintasa de *Pasteurella multocida*. Ferretti *et al.* revelan el operón de hialuronano sintasa de *Streptococcus pyogenes*, que está compuesto de tres genes, hasA, hasB, y hasC, que codifican hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa y UDP-glucosa pirofosforilasa respectivamente (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001). WO 99/51265 describe un segmento de ácido nucleico con una región codificante para una hialuronato sintasa de *Streptococcus equisimilis*.

## ES 2 360 188 T3

La producción de ácido hialurónico, particularmente de peso molecular promedio bajo, tal como, inferior a 1 MDa, se consigue más frecuentemente aislando inicialmente el material de peso molecular más alto (>1MDa) del caldo de fermentación o de las fuentes animales. La reducción deseada en peso molecular se consigue entonces, típicamente, mediante el fraccionamiento mediante medios mecánicos/físicos o por medios químicos.

5

El fraccionamiento ha sido realizado sobre una membrana de tamaño selectivo con las fracciones resultantes de un peso molecular medio del orden de 30.000-730.000 Dalton, siendo las moléculas más grandes retenidas por la membrana. También se establece correctamente una precipitación solvente, las moléculas más grandes son precipitadas primero, pero este método carece de la resolución de fraccionamiento de membrana. En general, los métodos de fraccionamiento tienden a ser favorables para aislar moléculas más grandes y no son realmente adecuados para la producción de moléculas pequeñas.

10

Usando medios mecánicos, las moléculas se someten a una tensión de cizallamiento suficiente para causar rotura. Por ejemplo, material de HA de 1.700.000 Da se puede reducir por debajo de 500.000 Da en un homogenizador de alta presión (WO9104279-A). El método se puede aumentar proporcionalmente con, por ejemplo, máquinas tipo Manton-Gaulin, estando éstas disponibles en varias escalas y siendo capaces de procesar material a índices de 10 l/h hasta del orden de varios m<sup>3</sup>/h.

15

Se ha comprobado que medios físicos, tales como la exposición a ultrasonidos, también funcionan, pero resulta difícil implementar tales métodos para algo mucho más grande que la escala de laboratorio (Orvisky *et al.* 1993. Size exclusion chromatographic characterization of sodium hyaluronate fractions prepared by high energetic sonication. *Chromatographia* vol. 37 (1-2): 20-22).

20

Medios químicos, tales como hidrólisis a los valores extremos de pH, también han sido descritos, o en presencia de otros productos químicos. Tales métodos pueden ser inadecuados si el mediador de pH o químico no debe estar presente en el producto final, o si es necesario un control fino para iniciar y detener el proceso; índices de mezcla pueden estar limitando a gran escala.

25

Cuando se aísla el HA de fuentes animales, no existe ningún control sobre el PM inicial, es casi siempre de orden alto (>5Da). El HA fermentado a partir de microorganismos de tipo salvaje tiene más frecuentemente un PM inferior que el de fuentes animales, pero sigue siendo superior a 1 MDa.

30

Se ha citado frecuentemente que el HA de fermentaciones de *Streptococcus* de tipo salvaje tiene un peso molecular medio del orden de 1.5 MDa a 3.2 MDa. Se informó de que *Streptococcus zooepidemicus* que fue cultivado en una instalación donde había un índice de crecimiento específico máximo a 40°C producía ácido hialurónico con un peso molecular cada vez más alto cuando la temperatura de fermentación fue reducida de 40°C a 32°C. Se sugirió que esto era el resultado de un índice de crecimiento específico de disminución (Armstrong & Johns. 1997. *Appl. Envir. Microbiol.* vol. 63: 2759-2764). Otros autores han confirmado la existencia de una correlación entre el índice de crecimiento específico de *S. zooepidemicus* y su productividad de HA, así como el peso molecular del HA que produce (Chong B.F., *et al.* 2005. *Microbial hyaluronic acid production.* *Appl. Microbiol. and Biotech.* vol. 66(4): 341-351). No obstante, la bibliografía en el tema de la producción de HA microbiano está completamente focalizada en maximizar el peso molecular del HA, no en reducirlo.

35

40

Producción de HA en *Bacillus subtilis* ha sido descrita también (Widner *et al.* 2005. *Appl. Envir. Microbiol.* vol 71: 3747-3752).

45

Los bacilos están bien establecidos como sistemas de célula huésped para la producción de proteínas nativas y recombinantes, incluyendo expresión recombinante de enzimas de ácido hialurónico sintasa exógenas que permiten a la célula huésped producir ácido hialurónico (WO 2003054163). Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para producir un ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado bajo, del orden de 300.000-800.000 Dalton, en una célula huésped de *Bacillus*.

50

### Resumen de la invención

55

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de ácido hialurónico con un peso molecular promedio bajo, tal como inferior a 800,000 Da, se consigue más frecuentemente aislando en primer lugar el material de PM más alto (>1MDa) y luego reduciendo el peso molecular, típicamente, mediante fraccionamiento, por medios mecánicos/físicos o por medios químicos.

60

La presente invención proporciona un método de fermentación con una célula huésped recombinante que produce directamente HA con el PM promedio bajo deseado inferior a 800,000 Da, que a su vez proporciona numerosos beneficios de procesamiento de flujo descendente.

65

Cuando un material HA se produce directamente con un PM bajo cercano al deseado, entonces cada paso del proceso de producción, incluyendo la fermentación y las operaciones de unidades de recuperación, se benefician de una viscosidad inferior. Además, se vuelve posible operar a una concentración global de HA más alta que con moléculas de un PM más alto. Esto libera capacidad de producción, permite un rendimiento más rápido y resulta en un proceso más eficiente que es más fácil de controlar. También se obtienen beneficios en el control de la calidad.

## ES 2 360 188 T3

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado del orden de 300.000-800.000 Dalton, incluyendo el método los pasos de:

- 5 (a) cultivo de una célula huésped recombinante de *Bacillus* a una primera temperatura propicia para su crecimiento, donde la célula huésped de *Bacillus* comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de codificación de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia promotora ajena a la secuencia de codificación de hialuronano sintasa;
- 10 (b) a continuación, cultivo de la célula huésped recombinante de *Bacillus* del paso (a) a una segunda temperatura superior a la primera temperatura del paso (a) según condiciones adecuadas para la producción del ácido hialurónico, donde la segunda temperatura es del orden de 40°C-52°C y al menos 5°C superior a la primera temperatura, mediante lo cual la célula huésped de *Bacillus* produce ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado en la gama seleccionada del grupo de gama de peso molecular que consiste en 300-400 kDa, 400-500 kDa, 500-600 kDa, 600-700 kDa, 700-800 kDa; y (c) recuperación del ácido hialurónico.

### Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra la tendencia para el peso molecular medio al final de las fermentaciones como una función de la temperatura final de fermentación, como determina GPC-MALLS. La figura muestra que un PM deseado puede ser seleccionado mediante la manipulación de la temperatura de fermentación. Existe un máximo a temperaturas bajas finales de 17°C, y un mínimo a temperaturas de fermentación altas de 52°C. La identidad del máximo real ha sido protegida seleccionando un origen distinto de cero para el peso molecular.

### 25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir un ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado del orden de 300.000-800.000 Dalton, incluyendo los métodos los pasos de:

- 30 (a) cultivo de una célula huésped recombinante de *Bacillus* a una primera temperatura propicia para su crecimiento, donde la célula huésped de *Bacillus* comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de codificación de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia promotora ajena a la secuencia de codificación de hialuronano sintasa;
- 35 (b) a continuación, cultivo de la célula huésped recombinante de *Bacillus* del paso (a) a una segunda temperatura superior a la primera temperatura del paso (a) bajo condiciones adecuadas para la producción del ácido hialurónico, donde la segunda temperatura es del orden de 40°C-52°C y al menos 5°C superior a la primera temperatura, por lo cual la célula huésped de *Bacillus* produce ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado en la gama seleccionada del grupo de gama de peso molecular que consiste en 300-400 kDa, 400-500 kDa, 500-600 kDa, 600-700 kDa, 700-800 kDa; y (c) recuperación del ácido hialurónico.

45 Los métodos de la presente invención representan una mejora respecto a la producción de hialuronano de un patógeno, encapsulando bacterias con los posteriores pasos del proceso para reducir el peso molecular. Al encapsular las bacterias, se produce una gran cantidad de hialuronano en la cápsula. En el procesamiento y depuración del hialuronano de tales fuentes, es necesario en primer lugar eliminar el hialuronano de la cápsula mediante el uso, por ejemplo, de un tensioactivo o detergente, tal como SDS. Esto crea una complicación en la producción comercial de hialuronano, ya que el tensioactivo debe ser adicionado para liberar una parte grande del hialuronano, y posteriormente dicho tensioactivo debe ser eliminado antes de la purificación final.

50 La presente invención permite la producción de una gran cantidad de hialuronano de PM bajo, que se produce en una célula huésped no encapsulada segura, como hialuronano libre.

55 Puesto que el hialuronano de la célula recombinante de *Bacillus* se expresa directamente al medio de cultivo, se puede utilizar un proceso simple para aislar el hialuronano del medio de cultivo. Primero, las células de *Bacillus* y el detrito celular se eliminan físicamente del medio de cultivo. El medio de cultivo puede ser diluido primero, si se desea, para reducir la viscosidad del medio. Muchos métodos son conocidos por los expertos en la materia para la eliminar las células del medio de cultivo, tales como centrifugado o micro filtración. Si se desea, el sobrenadante restante puede luego ser filtrado, por ejemplo mediante ultrafiltración, para concentrar y eliminar pequeños contaminantes moleculares del hialuronano. Después de la eliminación de las células y el detrito celular, se realiza una precipitación simple del hialuronano desde el medio mediante mecanismos conocidos. Sal, alcohol, o combinaciones de sal y alcohol se pueden utilizar para precipitar el hialuronano del filtrado. Una vez reducido a un precipitado, el hialuronano puede ser fácilmente aislado de la solución mediante medios físicos. Alternativamente, el hialuronano se puede secar o concentrar a partir de la solución filtrada usando técnicas vaporizables conocidas en la técnica, tal como secado por atomización.

65 Los métodos de la presente invención representan por tanto una mejora sobre las técnicas existentes para producir comercialmente hialuronano por fermentación, al no requerir el uso de un tensioactivo en la purificación de hialuronano de células en cultivo.

## ES 2 360 188 T3

En los métodos de la invención, el huésped de *Bacillus* se cultiva a una primera temperatura propicia para su crecimiento con el fin de desarrollar una gran cantidad de biomasa activa para la posterior síntesis de HA. Los bacilos son capaces de crecer con una amplia gama de temperaturas, siempre que no existan otros factores que lo limiten. Por ejemplo, en medios de cultivo ricos, hay que asegurar una aireación suficiente a temperaturas más altas para conseguir un alto índice de crecimiento específico.

Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere al método del primer aspecto, donde la primera temperatura es del orden de 10°C-60°C, preferiblemente 20°C-50°C, y más preferiblemente del orden de 30°C-45°C, de la forma más preferible del orden de 34°C-40°C.

Una vez la cantidad deseada de biomasa ha sido establecida, el huésped de *Bacillus* se cultiva a una segunda temperatura que se fija al menos 5°C superior a la primera temperatura durante la construcción de la biomasa, y bajo condiciones adecuadas para la producción del ácido hialurónico. Precisamente cómo de alta se fije la segunda temperatura, depende del PM deseado de HA a producir. Cuanto más bajo sea el PM deseado, más alta deberá fijarse la temperatura.

Así, la segunda temperatura es del orden de 40°C-52°C. Naturalmente, las gamas preferidas de la primera temperatura de cultivo se deben combinar con las gamas adecuadas preferidas de la segunda temperatura de cultivo en el método de la invención.

La segunda temperatura es al menos 5°C superior a la primera temperatura, preferiblemente la segunda temperatura es de al menos 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, y de la forma más preferible al menos 30°C superior a la primera temperatura.

La duración del paso de cultivo a la primera temperatura en los métodos de la invención, donde la biomasa es incrementada, depende de varios factores, incluyendo las condiciones de cultivo, el volumen de fermentación, la cepa de *Bacillus* particular elegida, etc. y, por supuesto, también la primera temperatura. La duración del paso de cultivo a la segunda temperatura, que es cuando se produce el HA de PM bajo, también depende de distintos factores. Consecuentemente, el tiempo total de cultivo, que es definido como la duración de ambos pasos de cultivo, no se determina fácilmente. No obstante, en una forma de realización preferida, el paso de cultivo a la segunda temperatura requiere al menos un 20% del total de tiempo de cultivo, preferiblemente el paso de cultivo a la segunda temperatura requiere al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o de la forma más preferible al menos un 90% del total de tiempo de cultivo.

Una forma de realización preferida se refiere al método del primer aspecto, donde la segunda temperatura es suficientemente superior a la primera temperatura para permitir a la célula huésped de *Bacillus* producir ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado en una gama seleccionada del grupo de gamas de peso molecular que consiste en 300-350 kDa, 350-400 kDa, 400-450 kDa, 450-500 kDa, 500-550 kDa, 550-600 kDa, 600-650 kDa, 650-700 kDa, 700-750 kDa, y 750-800 kDa.

Otra forma de realización preferida se refiere al método del primer aspecto, donde la segunda temperatura es suficientemente superior a la primera temperatura para permitir a la célula huésped de *Bacillus* producir ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado en una gama seleccionada del grupo de gamas de peso molecular que consiste en 300-400 kDa, 400-500 kDa, 500-600 kDa, 600-700 kDa, 700-800 kDa.

El nivel de ácido hialurónico producido por una célula huésped de *Bacillus* de la presente invención se puede determinar según el método del carbazol modificado (Bitter y Muir, 1962 Anal Biochem. 4: 330-334). Por otra parte, el peso molecular medio del ácido hialurónico puede ser determinado usando métodos estándar de la técnica, tales como los descritos por Ueno *et al.*, 1988, Chem. Farm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "DAWN EOS Manual" y "Light Scattering University DAWN Course Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California.

El ácido hialurónico obtenido mediante los métodos de la presente invención se puede someter a varias técnicas conocidas en la técnica para modificar el ácido hialurónico, como la reticulación, como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N.ºs. 5.616.568, 5.652.347 y 5.874.417. Por otra parte, el peso molecular del ácido hialurónico puede ser alterado usando técnicas conocidas en la técnica.

### 60 Células huéspedes

En los métodos de la presente invención, la célula huésped de *Bacillus* puede ser cualquier célula de *Bacillus* adecuada para la producción recombinante de ácido hialurónico. La célula huésped de *Bacillus* puede ser una célula de *Bacillus* de tipo salvaje o un mutante de la misma. Células de *Bacillus* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de *Bacillus agaraderhens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*. Células de *Bacillus subtilis* mutantes particularmente adaptadas para la expresión recombi-

nante son descritas en WO 98/22598. Células de *Bacillus* no encapsuladas son particularmente útiles en la presente invención.

En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*,  
 5 *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus clausii*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus*  
 10 es una célula de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula huésped de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* A164A5 (ver patente estadounidense n.º. 5.891.701) o *Bacillus subtilis* 168Δ4.

La transformación de la célula huésped de *Bacillus* con un constructo de ácidos nucleicos de la presente invención puede, por ejemplo, ser efectuada mediante transformación del protoplasto (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979,  
 15 Molecular General Genetics 168:111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Torne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278).

#### 20 *Constructos de ácidos nucleicos*

“Constructo de ácidos nucleicos” es definido aquí como una molécula de ácido nucleico, ya sea mono o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácido nucleico que se combinan yuxtaponen de un modo tal que de lo contrario no existirían en la naturaleza. El término constructo de  
 25 ácidos nucleicos puede ser sinónimo del término cassette de expresión cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante. El término “secuencia codificante” es definido aquí como una secuencia que es transcrita en ARNm y traducida en una enzima de interés cuando se coloca bajo el control de las secuencias de control mencionadas más abajo. Los bordes de la secuencia codificante están generalmente determinados por un sitio de unión al ribosoma localizado justo arriba del marco de lectura abierto en el extremo 5’ del ARNm y una secuencia de terminación de la transcripción localizada justo abajo del marco de lectura abierto en el extremo 3’ del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADN, ADNc y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, aislamiento del ADN genómico, preparación del ADNc o una combinación de ambas. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando una selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas o la conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR). Ver, por ejemplo, Innis  
 40 *et al.*, 1990, PCR Protocols: Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa, transcripción activada ligada y amplificación basada en las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser utilizados. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento deseado de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula de *Bacillus* donde clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán replicados. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético o de cualquier combinación de los mismos.

Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una enzima puede ser manipulada de varias maneras con el fin de mantener la expresión de la enzima. La manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos antes de su inserción en un constructo o vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión o célula huésped de *Bacillus*. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de clonación son conocidas en la técnica. Se entenderá que la secuencia de ácidos nucleicos puede también ser manipulada *in vivo* en la célula huésped usando métodos conocidos en la técnica.

Varias enzimas intervienen en la biosíntesis de ácido hialurónico. Estas enzimas incluyen sintasa de hialuronano, UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, amidotransferasa, mutasa, y acetiltransferasa. La hialuronano sintasa es la enzima clave en la producción de ácido hialurónico.

La “hialuronano sintasa” es definida aquí como una sintasa que cataliza el alargamiento de una cadena de hialuronano mediante la adición de azúcares precursores GlcUA y GlcNAc. Las secuencias de aminoácidos de hialuronano sintasas estreptocócicas, hialuronano sintasas vertebradas y la hialuronano sintasa vírica son diferentes a la hialuronano sintasa de *Pasteurella*, y se ha propuesto que se clasifiquen como Grupo I y Grupo II de hialuronano sintasas, incluyendo el Grupo I de hialuronano sintasas las hialuronano sintasas estreptocócicas (DeAngelis, 1999). Para la producción de hialuronano en células huéspedes de *Bacillus*, las hialuronano sintasas de origen eucariota, tales como hialuronano sintasas de células de mamíferos, son menos preferidas.

## ES 2 360 188 T3

La secuencia de codificación de hialuronano sintasa puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos capaz de ser expresada en una célula huésped de *Bacillus*. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de cualquier origen. Genes de hialuronano sintasa preferidos incluyen cualquiera del Grupo I o Grupo II, tales como genes de hialuronano sintasa del Grupo I a partir de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi subesp. zooepidemicus*, o genes de hialuronano sintasa del Grupo II de *Pasteurella multocida*.

Los métodos de la presente invención también incluyen constructos mediante los que se suministran azúcares precursores de hialuronano a la célula huésped, bien al medio de cultivo, o estando codificados por genes endógenos, por genes no endógenos, o por una combinación de genes endógenos y no endógenos en la célula huésped de *Bacillus*. El azúcar precursor puede ser ácido D-glucurónico o N-acetil-glucosamina.

En los métodos de la presente invención, el constructo de ácidos nucleicos puede comprender además uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis de un azúcar precursor de hialuronano. Alternativamente, la célula huésped de *Bacillus* puede comprender además uno o más segundos constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis del azúcar precursor. La producción de hialuronano se mejora mediante el uso de constructos con una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias que codifican un gen o genes que dirigen un paso en la vía de síntesis del azúcar precursor de hialuronano. Por “dirigir un paso en la vía de síntesis del azúcar precursor de hialuronano” se entiende que la proteína expresada del gen tiene un papel activo en la formación de N-acetil-glucosamina o ácido D-glucurónico, o un azúcar que es un precursor tanto de N-acetil-glucosamina como de ácido D-glucurónico.

En un método preferido para suministrar azúcares precursores, se dispone de constructos para mejorar la producción de hialuronano en una célula huésped con una hialuronano sintasa, mediante el cultivo de una célula huésped con un constructo recombinante con una región promotora heteróloga operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige un paso en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano. En un método preferido la célula huésped también comprende un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a una hialuronano sintasa, que puede usar la misma región promotora o una diferente a la secuencia de ácidos nucleicos para una sintasa implicada en la biosíntesis de N-acetil-glucosamina. En otra forma de realización preferida, la célula huésped puede tener un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a secuencias de ácidos nucleicos diferentes que codifican un segundo gen implicado en la síntesis de un azúcar precursor de hialuronano.

Así, la presente divulgación también se refiere a constructos para mejorar la producción de hialuronano mediante el uso de constructos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifican un gen que dirige un paso en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano. La secuencia de ácidos nucleicos al azúcar precursor se puede expresar desde el mismo promotor que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronano sintasa, o uno diferente.

Los genes implicados en la biosíntesis de azúcares precursores para la producción de ácido hialurónico incluyen un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, gen de UDP-glucosa pirofosforilasa, gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa, gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amido-transferasa, gen de mutasa y gen de acetil transferasa.

En una célula que contiene una hialuronano sintasa, cualquiera o una combinación de dos o más genes de *hasB*, *hasC* y *hasD*, o sus homólogos, tales como el *Bacillus subtilis tuaD*, *gtab*, y *gcaD*, respectivamente, al igual que *hasE*, se pueden expresar para aumentar los depósitos de azúcares precursores disponibles para la hialuronano sintasa. El genoma de *Bacillus* es descrito en Kunst *et al.*, Nature 390, 249-256, “The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*” (20 Noviembre 1997). En algunos ejemplos, tales como donde la célula huésped no tiene una actividad nativa de hialuronano sintasa, el constructo puede incluir el gen *hasA*.

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las enzimas biosintéticas pueden ser nativas para la célula huésped, mientras que en otros casos se puede utilizar una secuencia heteróloga. Si dos o más genes son expresados, puede que sean genes que se asocian el uno con el otro en un operón nativo, tal como los genes del operón HAS de *Streptococcus equisimilis*, que comprenden *hasA*, *hasB*, *hasC* y *hasD*. En otros ejemplos, se puede desear el uso de alguna combinación de las secuencias del gen precursor, sin incluir cada elemento del operón. También se puede preferir en otros casos el uso de algunos genes nativos para la célula huésped y otros que sean exógenos. La elección dependerá de los depósitos disponibles de azúcares en una célula huésped, de la capacidad de la célula para alojar sobreproducción sin interferir con otras funciones de la célula huésped y de si la célula regula la expresión de sus genes nativos de manera diferente a la de los genes exógenos.

Como ejemplo, dependiendo de los requisitos metabólicos y condiciones de crecimiento de la célula, y de los depósitos de azúcar precursor disponibles, puede ser deseable aumentar la producción de N-acetil-glucosamina mediante expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifique UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, tal como el gen *hasD*, el gen *gcaD* de *Bacillus*, y homólogos de los mismos. Alternativamente, el azúcar precursor puede ser ácido D-glucurónico. En tal forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen el gen *tuaD* de *Bacillus*, el gen *hasB* de *Streptococcus* y homólogos de los mismos. La secuencia de ácidos nucleicos, puede también codificar UDP-glucosa pirofosforilasa, tal como en el gen *gtab* *Bacillus*, el gen *hasC* de *Streptococcus* y homólogos de los mismos.

## ES 2 360 188 T3

En los métodos de la presente invención, el gen de UDP-glucosa 6-dehidrogenasa puede ser un gen *hasB* o un gen *tuaD*; u homólogos de los mismos.

5 En los métodos de la presente invención, el gen de UDP-glucosa pirofosforilasa puede ser un gen *hasC* o un gen *gtaB*; u homólogos de los mismos.

En los métodos de la presente invención, el gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa puede ser un gen *hasD* o *gcaD*; u homólogos de los mismos.

10 En los métodos de la presente invención, el gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa puede ser un gen *hasE* u homólogo del mismo.

En los métodos de la presente invención, el gen de hialuronano sintasa y uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor. Alternativamente, uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor, pero un promotor diferente dirige el gen de hialuronano sintasa. Otra alternativa es que el gen de hialuronano sintasa y cada uno de los genes que codifican un azúcar precursor estén bajo el control de diferentes promotores. En una forma de realización preferida, el gen de hialuronano sintasa y uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor.

20 En algunos casos, la célula huésped tendrá un constructo recombinante con una región promotora heteróloga operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige un paso en la vía de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano, que puede estar conjuntamente con la expresión de hialuronano sintasa de un constructo recombinante. La hialuronano sintasa se puede expresar de la misma región promotora o una diferente que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima implicada en la biosíntesis del precursor. En otra forma de realización preferida, la célula huésped puede tener un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos diferente que codifica un segundo gen implicado en la síntesis de un azúcar precursor de hialuronano.

30 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las enzimas implicadas en la biosíntesis del/los azúcar(es) precursor(es) se puede expresar del mismo promotor o uno diferente como la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronano sintasa. En el sentido primero, los “operones artificiales” son constructos que pueden imitar al operón de *Streptococcus equisimilis* en tener cada uno *hasA*, *hasB*, *hasC* y *hasD*, u homólogos de los mismos, o, alternativamente, pueden utilizar menos que el complemento completo presente en el operón de *Streptococcus equisimilis*. Los operones artificiales pueden comprender también un gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa (*hasE*) al igual que uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amidotransferasa, gen de mutasa y gen de acetil transferasa. En el operón artificial, al menos uno de los elementos es heterólogo a otro de los elementos, tal como la región promotora que es heteróloga a las secuencias codificantes.

40 En una forma de realización preferida del método, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA*, *tuaD*, y *gtaB*. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA*, *tuaD*, *gtaB*, y *gcaD*. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA* y *tuaD*. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA*. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA*, *tuaD*, *gtaB*, *gcaD*, y *hasE*. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA*, *hasB*, *hasC*, y *hasD*. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende *hasA*, *hasB*, *hasC*, *hasD*, y *hasE*. Basándose en las formas de realización anteriores preferidas, los genes notados se pueden sustituir con homólogos de los mismos.

50 En los métodos de la presente invención, los constructos de ácidos nucleicos comprenden una secuencia codificante de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia promotora externa a la secuencia de codificación de hialuronano sintasa. La secuencia promotora puede ser, por ejemplo, un único promotor o un promotor en serie.

Un “promotor” se define aquí como una secuencia de ácidos nucleicos implicada en la unión de RNA-polimerasa dirigida por ADN para iniciar la transcripción de un gen. “Promotor tándem” es definido aquí como dos o más secuencias promotoras, cada una de las cuales está operativamente enlazada a una secuencia codificante y media la transcripción de la secuencia codificante en ARNm. “Operativamente enlazado” se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control, por ejemplo, una secuencia promotora, está apropiadamente colocada en una posición en relación a una secuencia codificante de manera que la secuencia de control dirige la producción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante. Como se ha apuntado anteriormente, una “secuencia codificante” es definida aquí como una secuencia de ácidos nucleicos que es transcrita en ARNm y traducida en un polipéptido colocado bajo el control de las secuencias de control apropiadas. Los bordes de la secuencia codificante están generalmente determinados por un sitio de unión al ribosoma localizado justo encima del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia del terminador de transcripción localizada justo abajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADN genómico, ADNc, semisintético, sintético y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

65 En una forma de realización preferida del método, las secuencias promotoras se pueden obtener de una fuente bacteriana. En una forma de realización más preferida, las secuencias promotoras se pueden obtener de una bacteria gram positiva tal como una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa de *Bacillus agaradherens*, *Bacillus alkalophilus*,



## ES 2 360 188 T3

*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o de una bacteria gram negativa, por ejemplo, *E. coli* o *Pseudomonas sp.*

5 Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos en los métodos de la presente invención son los promotores obtenidos del operón lac en *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gen de proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus lentus* o *Bacillus clausii*, gen de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (gen de subtilisina Carlsberg), gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (*amyE*) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *CryIII*A de *Bacillus thuringiensis subesp. tenebrionis* (*cryIII*A) o partes del mismo, gen procariota de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731). Otros ejemplos son el promotor del bacteriófago spo1 y el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25). Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242:74-94; y en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor, Nueva York.

20 El promotor puede también ser un promotor de "consenso" que tiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". El promotor de consenso se puede obtener de cualquier promotor que pueda funcionar en una célula huésped de *Bacillus*. La construcción de un promotor de "consenso" se puede realizar mediante mutagénesis dirigida para crear un promotor que se ajuste más perfectamente a las secuencias de consenso establecidas para las regiones "-10" y "-35" de los promotores vegetativos "tipo sigma A" para *Bacillus subtilis* (Voskuil *et al.*, 1995, Molecular Microbiology 17: 271-279).

30 En una forma de realización preferida, el promotor de "consenso" se obtiene de un promotor obtenido del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus clausii* o gen de proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus lentus*, gen de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (gen de subtilisina Carlsberg), gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* (*amyE*), gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *CryIII*A de *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis* (*cryIII*A) o partes de los mismos, o gen de beta-lactamasa procariótica del promotor de bacteriófago spo1. En una forma de realización más preferida, el promotor de "consenso" se obtiene de genes de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*.

40 Widner, *et al.*, patentes estadounidenses Nos. 6.255.076 y 5.955.310 describen promotores tándem y constructos y métodos para su uso en la expresión en células de *Bacillus*, incluyendo el promotor de consenso corto *amyQ* (también llamado scBAN). También se describe en estos documentos el uso de la secuencia estabilizadora *cryIII*A y constructos que usan la secuencia para una producción mejorada en *Bacillus*.

45 Cada secuencia promotora del promotor tándem puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestra actividad transcripcional en la célula de *Bacillus* a elegir incluyendo un promotor mutante, truncado e híbrido, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, bien homólogos o heterólogos a la célula de *Bacillus*. Cada secuencia promotora puede ser nativa o externa a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido y nativa o externa a la célula de *Bacillus*. Las secuencias promotoras pueden ser las mismas secuencias promotoras o secuencias promotoras diferentes.

50 Las dos o más secuencias promotoras del promotor tándem pueden promover simultáneamente la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos. Alternativamente, una o más secuencias promotoras del promotor tándem pueden promover la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos a estadios diferentes de crecimiento de la célula de *Bacillus*.

55 En una forma de realización preferida, el promotor en serie contiene al menos el promotor *amyQ* del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización preferida, el promotor en serie contiene al menos un promotor de "consenso" que tiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de *amyL* del gen alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor *cryIII*A o partes del mismo (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13:97-107).

60 En una forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor *amyL* y el promotor *cryIII*A. En otra forma de realización más preferida, el promotor en serie contiene al menos el promotor *amyQ* y el promotor *cryIII*A. En otra forma de realización más preferida, el promotor en serie contiene al menos un promotor de "consenso" que tiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10", y el promotor *cryIII*A. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor de *amyL*. En otra forma de realización más preferida, el promotor en serie contiene al menos dos copias del promotor *amyQ*. En otra forma de realización más preferida, el promotor en serie contiene al menos dos copias de un promotor de "consenso" que tiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor *cryIII*A.

“Una secuencia de procesamiento/estabilizadora de ARNm” es definida aquí como una secuencia localizada en sentido descendente de una o más secuencias promotoras y en sentido ascendente de una secuencia codificante a la que cada secuencia promotora, una o más, están operativamente enlazadas de manera que todos los ARNms sintetizados de cada secuencia promotora se pueden procesar para generar transcritos de ARNm con una secuencia estabilizadora en el extremo 5’ de los transcritos. La presencia de tal secuencia estabilizadora en el extremo 5’ en los transcritos de ARNm aumenta su vida media (Agaisse y Lereclus, 1994, *supra*, Hue *et al.*, 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471). La secuencia de procesamiento/estabilizadora de ARNm es complementaria al extremo 3’ de un ARN ribosómico 16S bacteriano. En una forma de realización preferida del método, la secuencia de procesamiento/estabilizadora de ARNm genera esencialmente transcritos monotamaño con una secuencia estabilizante en el extremo 5’ de los transcritos. La secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm es preferiblemente una, que es complementaria al extremo 3’ de un ARN ribosómico 16S bacteriano. Ver patentes estadounidenses n.05 6.255.076 y 5.955.310.

En una forma de realización más preferida, la secuencia de procesamiento/estabilizadora de ARNm es la secuencia de procesamiento/estabilizadora de ARNm *cryIIA* de *Bacillus thuringiensis* descrita en WO 94/25612 y Agaisse y Lereclus, 1994, *supra*, o partes de las mismas que retienen la función de procesamiento/estabilizante del ARNm. En otra forma de realización más preferida, la secuencia de procesamiento/estabilizante del ARNm es la secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm SP82 de *Bacillus subtilis* descrita en Hue *et al.*, 1995, *supra*, o partes de las mismas que retienen la función de procesamiento/estabilizante del ARNm.

Cuando el promotor *cryIIIA* y su secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm se emplean en los métodos de la presente invención, se puede utilizar un fragmento de ADN que contiene la secuencia descrita en WO 94/25612 y Agaisse y Lereclus, 1994, *supra*, o partes de las mismas que retienen el promotor y funciones de procesamiento/estabilizante del ARNm. Además, se pueden preparar fragmentos de ADN que contienen sólo el promotor *cryIIIA* o sólo la secuencia *cryIIIA* de procesamiento/estabilizante de ARNm usando métodos conocidos en la técnica para construir varios promotores tándem y combinaciones de secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm. En esta forma de realización, el promotor *cryIIIA* y su secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm se colocan preferiblemente en sentido descendente de la(s) otra(s) secuencia(s) promotora(s) constituyendo el promotor tándem y en sentido ascendente de la secuencia codificante del gen de interés.

La secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la(s) enzima(s) deseada(s) implicada(s) en la producción de ácido hialurónico puede entonces ser manipulada posteriormente para mejorar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. Se entenderá que la expresión incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de clonación son bien conocidas en la técnica.

Un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima puede estar operativamente enlazado a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la secuencia codificante en una célula de *Bacillus* en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “secuencias de control” se define aquí incluyendo todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de la secuencia codificante de una secuencia de ácidos nucleicos. Cada secuencia de control puede ser nativa o externa a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima. Además de las secuencias promotoras anteriormente descritas, tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima.

La secuencia de control puede también ser una secuencia del terminador de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula de *Bacillus* para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está operativamente enlazada al extremo 3’ de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima o la última enzima de un operón. Cualquier terminador que sea funcional en la célula de *Bacillus* elegida se puede utilizar en la presente invención.

La secuencia de control puede también ser una secuencia guía adecuada, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por la célula de *Bacillus*. La secuencia guía está operativamente enlazada al extremo 5’ de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima. Cualquier secuencia guía que sea funcional en la célula de *Bacillus* elegida se puede utilizar en la presente invención.

La secuencia de control puede también ser una región codificante del péptido señal, que codifica una secuencia de aminoácidos enlazados al amino terminal de un polipéptido que puede dirigir el polipéptido expresado en la vía secretora de la célula. La región codificante del péptido señal puede ser nativa al polipéptido o se puede obtener de fuentes externas. El extremo 5’ de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede contener intrínsecamente una región codificante del péptido señal naturalmente enlazado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5’ de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es externa a esa parte de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. La región codificante del péptido señal exógeno puede ser requerida cuando la secuencia codificante no contiene normalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente,

la región codificante del péptido señal externo puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para obtener una secreción mejorada del polipéptido en relación con la región codificante del péptido señal natural normalmente asociada a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal se puede obtener de un gen amilasa o proteasa de una especie de *Bacillus*. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal capaz de dirigir el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula de *Bacillus* a elegir se puede utilizar en la presente invención.

Una región codificante del péptido señal eficaz para células de *Bacillus* es la región codificante del péptido señal obtenida del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, el gen de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de subtilisina de *Bacillus licheniformis*, el gen de beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, los genes de proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y el gen *prsA* de *Bacillus subtilis*. Además péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57:109-137.

La secuencia de control puede también ser una región codificante del propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido está generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido maduro activo mediante la escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*) y proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*).

Cuando ambos péptidos señal y regiones de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la región del propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al término amino de la región del propéptido.

También se puede desear añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen para ser activado o desactivado en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procariontes incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac*, y *trp*.

#### Vectores de expresión

En los métodos de la presente invención, un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales se puede utilizar para la producción recombinante de una enzima implicada en la producción de ácido hialurónico. Las diferentes secuencias de ácidos nucleicos y de control anteriormente descritas se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o enzima en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos se puede expresar mediante la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos o de un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión y posible secreción.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueden provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula de *Bacillus* en la que se ha de introducir el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares, lineales o cerrados. El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula de *Bacillus*, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que ha sido integrado. El sistema de vectores lo puede componer un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma de la célula de *Bacillus*, o se puede usar un transposón.

Los vectores contienen preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped de *Bacillus* o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración del vector en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula de *Bacillus*. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten al vector integrarse en el genoma celular de *Bacillus* en una ubicación precisa dentro del cromosoma. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 1.500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1.500 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 1.500 pares de bases, que son altamente homólogos a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea

homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula de *Bacillus*. Además, los elementos integracionales pueden ser codificantes o no codificantes de secuencias de ácidos nucleicos. En cambio, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

5 Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse de manera autónoma en la célula de *Bacillus* en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 que permiten la replicación en *Bacillus*. El origen de replicación puede ser uno que tenga una mutación para realizar su función termosensible en la célula de *Bacillus* (ver, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU  
10 75:1433).

Los vectores contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como ampicilina, canamicina, cloranfenicol o resistencia a la tetraciclina. Además, la selección se puede realizar mediante cotransformación, por ejemplo, como se describe en WO 91/09129, donde el marcador seleccionable está en un vector separado.

20 Más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos se puede insertar en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de ácidos nucleicos se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de ácidos nucleicos, donde las células contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y así se pueden seleccionar copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado. Un método conveniente para conseguir la amplificación de secuencias de ADN genómico se describe en WO 94/14968.

Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes son conocidos por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

30

### Producción

En los métodos de la presente invención, las células huéspedes de *Bacillus* se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del ácido hialurónico usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña escala o gran escala (incluyendo fermentación continua, en lote, en flujo discontinuo o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis del ácido hialurónico y la separación del ácido hialurónico. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). El ácido hialurónico segregado puede ser recuperado directamente del medio.

45 El ácido hialurónico resultante se puede aislar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido hialurónico puede ser aislado del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. El ácido hialurónico aislado puede ser además purificado posteriormente mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico) o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

En los métodos de la presente invención, las células huéspedes de *Bacillus* producen más de aproximadamente 4 g de ácido hialurónico por litro, preferiblemente más de aproximadamente 6 g, más preferiblemente más de aproximadamente 8 g, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 10 g, y de la forma más preferible más de aproximadamente 12 g de ácido hialurónico por litro.

### 60 Dotaciones/Interrupciones

La delección o técnicas de sustitución de genes se pueden utilizar para la eliminación completa de un gen marcador seleccionable u otro gen indeseable. En tales métodos, la delección del gen marcador seleccionable puede ser realizada mediante recombinación homóloga usando un plásmido que ha sido construido para contener de manera contigua las regiones 5' y 3' que flanquean el gen marcador seleccionable. Las regiones contiguas 5' y 3' se pueden introducir en una célula de *Bacillus* en un plásmido termosensible, por ejemplo, pE194, en asociación con un segundo marcador seleccionable a una temperatura permisiva para permitir al plásmido establecerse en la célula. La célula se desplaza luego a una temperatura no permisiva para seleccionar las células que tienen el plásmido integrado en el cromosoma

## ES 2 360 188 T3

en una de las regiones flanqueantes homólogas. La selección para la integración del plásmido se efectúa mediante la selección de un segundo marcador seleccionable. Después de la integración, se fomenta un evento de recombinación en la segunda región flanqueante homóloga mediante el desplazamiento de las células a la temperatura permisiva para diferentes generaciones sin selección. Las células son blindadas para obtener colonias individuales y las colonias son examinadas para la pérdida de ambos marcadores seleccionables (ver, por ejemplo, Perego, 1993, en A.L. Sonneshein, J.A. Hoch, y R. Losick, editors, *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, Capítulo 42, American Society of Microbiology, Washington, D.C., 1993).

Un gen marcador seleccionable puede también ser eliminado mediante recombinación homóloga introduciendo en la célula mutante un fragmento de ácido nucleico que comprenda las regiones 5' y 3' del gen defectuoso, pero sin el gen marcador seleccionable, y a continuación seleccionando el medio de contraselección. Mediante la recombinación homóloga, el gen defectuoso que contiene el gen marcador seleccionable es sustituido con el fragmento de ácido nucleico que no tiene el gen marcador seleccionable. Otros métodos conocidos en la técnica también pueden ser usados.

La patente estadounidense n.º 5.891.701 divulga técnicas para eliminar diferentes genes incluyendo *spoIIAC*, *aprE*, *nprE*, y *amyE*.

Otros compuestos biológicos indeseables pueden también ser eliminados mediante los métodos descritos anteriormente tales como el pigmento rojo sintetizado por *cypX* (n.º de acceso BG12580) y/o *yvmC* (n.º de acceso BG14121).

En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* se desmarca con cualquier marcador seleccionable heterólogo o exógeno. En otra forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* no produce ningún pigmento rojo sintetizado por *cypX* y *yvmC*.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Una cepa de *Bacillus* recombinante fue construida como se describe en detalle en WO 2003054163. Esta cepa fue luego cultivada de la siguiente manera: primero una fase de semilla en agar a una temperatura constante, luego una fase de semilla en un tanque agitado a temperatura constante y finalmente una fermentación principal de flujo continuo en un tanque agitado a una temperatura inicial favorable para el crecimiento de la cepa de *Bacillus*, por ejemplo a 37°C. Más tarde, después de la iniciación, la temperatura de fermentación se aumentó o disminuyó en experimentos separados a otras temperaturas varias de conjunto en la gama de 17-52°C. La temperatura se mantuvo luego constante durante un periodo de 7 h, siguiendo la iniciación de la fase de flujo continuo.

La cepa de *Bacillus* fue fermentada en pequeños fermentadores estándar en un medio que por litro contenía 6,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0 g de Na<sub>3</sub>-citrato-2H<sub>2</sub>O, 3,0 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6,0 ml de Mikrosoy-2, 0,15 mg de biotina (1 ml de 0,15 mg/ml etanol), 15,0 g de sacarosa, 1,0 ml de SB 2066, 2,0 ml de P2000, 0,5 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. El medio fue pH 6.3 a 6.4 (sin ajustar) antes de la autoclavación. El CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O fue añadido después del sometimiento a autoclave.

El medio de semilla usado fue B-3, es decir, Agar-3 sin agar, o medio "S/S-1". El medio Agar-3 contenía por litro 4,0 g de caldo nutritivo, 7,5 g de proteína hidrolizada, 3,0 g de extracto de levadura, 1,0 g de glucosa y 2% de agar. El pH no fue ajustado; el pH antes del sometimiento a autoclave era aproximadamente 6.8; después del sometimiento a autoclave era un pH 7.7 aproximadamente.

El medio de matraz de semilla de sacarosa/soja (S/S-1) estaba compuesto por cada litro de 65 g de sacarosa, 35 g de harina de soja, 2 g de Na<sub>3</sub>-citrato-2H<sub>2</sub>O, 4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 6 ml de elementos traza. El medio fue ajustado a pH de aproximadamente 7 con NaOH; después de la distribución del medio a matraces, se añadió un 0,2% de aceite vegetal para suprimir la formación de espuma. Los elementos traza estaban compuestos por litro de 100 g de H<sub>2</sub>O ácido cítrico, 20 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, y 2 g de ZnCl<sub>2</sub>.

El pH se ajustó a 6.8-7.0 con amonio antes de la inoculación, y luego fue controlado a pH 7.0 + 0.2 con amonio y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La temperatura se mantuvo a 37°C. La agitación fue de un máximo de 1300 r.p.m., usando dos turbinas Rushton de 6 palas y 6 cm de diámetro en un tanque de 3 litros con un volumen inicial de 1,5 litros. La aireación fue de un máximo de 1,5 MW.

Para la alimentación se usó una solución simple de sacarosa. La alimentación empezó aproximadamente 4 horas después de la inoculación, cuando el oxígeno disuelto (O.D.) estaba todavía siendo conducido abajo (es decir, antes de la depleción de sacarosa). La temperatura se cambió a una temperatura preseleccionada más alta del orden de 37-52°C. El índice de alimentación se aumentó luego linealmente de 0 a aproximadamente 6 g de sacarosa/LO-hr durante el intervalo de tiempo de 7 horas. Un índice de alimentación inferior, aumentado linealmente de 0 a aproximadamente 2 g de sacarosa/LO-hr, fue también usado en algunas fermentaciones.

## ES 2 360 188 T3

Se eliminaron células diluyendo 1 parte de cultivo con 3 partes de agua, mezclando bien y centrifugando a aproximadamente 30.000 x g para producir un claro sobrenadante y gránulo celular, que se puede lavar y secar.

5 Ensayos de concentración de ácido hialurónico fueron realizados usando el método ELISA, basado en una proteína de enlace de hialuronano (proteína y equipos disponibles comercialmente de Seikagaku America, Falmout, MA). Concentraciones de ácido hialurónico fueron determinadas usando el método del carbazol modificado (Bittery Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334).

10 Los pesos moleculares fueron determinados usando un ensayo de GPC MALLS. Se reunieron datos de ensayos de GPC MALLS usando el procedimiento siguiente. GPC-MALLS (cromatografía de permeación en gel o de exclusión por tamaño unida a dispersión de luz láser multiángulo) se utiliza generalmente para calificar los polímeros con un peso molecular (PM) alto. La separación de polímeros se consigue mediante cromatografía pg, basada en la subdivisión diferencial de moléculas de diferente PM entre eluyente y resina. El peso molecular promedio de un polímero individual se determina mediante MALLS basado en la extensión/ángulo de dispersión diferencial de moléculas de diferente PM. Los principios de GPC-MALLS y protocolos adecuados para el ácido hialurónico son descritos por Ueno *et al.*, 1988, Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" y "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California). Se usó una HPLC Isocrática Agilent 1100, una columna Tosoh Biosep G6000 PWxl para la cromatografía pg, y un Wyatt Down EOS para la MALLS. Un detector de índice de refracción Agilent G1362A fue enlazado abajo de la MALLS para determinar la concentración eluida. Varios productos de ácido hialurónico comerciales con pesos conocidos moleculares sirvieron como estándares.

25 Los resultados se muestran en la figura 1 como las tendencias para el peso molecular medio al final de las fermentaciones, como función de la temperatura de fermentación final, que se ha mantenido constante durante 7 horas, como determinó la GPC-MALLS. Sorprendentemente, la figura muestra que un PM deseado se puede seleccionar mediante una atenta selección y manipulación de las temperaturas de fermentación. Hay un PM máximo a temperaturas bajas finales de 17°C, y un PM mínimo a temperaturas de fermentación altas finales de 52°C.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de un ácido hialurónico con un peso molecular promedio bajo mediante fermentación controlada de temperatura, incluyendo el método los pasos de:
- 10 (a) cultivo de una célula huésped recombinante de *Bacillus* a una primera temperatura propicia para su crecimiento, donde la célula huésped de *Bacillus* comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia codificante de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia promotora exógena a la secuencia codificante de hialuronano sintasa;
- 15 (b) a continuación, cultivo de la célula huésped recombinante de *Bacillus* del paso (a) a una segunda temperatura superior a la primera temperatura del paso (a) según condiciones adecuadas para la producción del ácido hialurónico, donde la segunda temperatura es del orden de 40°C-52°C y al menos 5°C superior a la primera temperatura, por lo cual la célula huésped de *Bacillus* produce ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado en la gama seleccionada del grupo de las gamas de peso molecular que consisten en 300-400 kDa, 400-500 kDa, 500-600 kDa, 600-700 kDa, 700-800 kDa; y
- 20 (c) recuperación del ácido hialurónico.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia codificante de hialuronano sintasa codifica un Grupo I de hialuronano sintasa.
- 30 3. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia de codificación de hialuronano sintasa codifica un Grupo II de hialuronano sintasa.
- 35 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde un azúcar precursor del ácido hialurónico es suministrado o producido por la célula huésped de *Bacillus*.
- 40 5. Método según la reivindicación 4, donde el azúcar precursor es codificado por genes endógenos, por genes no endógenos o por una combinación de genes endógenos y no endógenos en la célula huésped de *Bacillus*.
- 45 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el constructo de ácidos nucleicos comprende además uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis de un azúcar precursor del ácido hialurónico o la célula huésped de *Bacillus* comprende además uno o más segundos constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis de un azúcar precursor del ácido hialurónico.
- 50 7. Método según la reivindicación 6, donde el gen o genes son seleccionados del grupo que consiste en un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, gen de UDP-glucosa pirofosforilasa, gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa, gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amidotransferasa, gen de mutasa y gen de acetiltransferasa.
- 55 8. Método según la reivindicación 7, donde el gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa es un gen *hasB* o un gen *tuaD*; u homólogos de los mismos.
- 60 9. Método según la reivindicación 7, donde el gen de UDP-glucosa pirofosforilasa es un gen *hasC* o un gen *gtaB*; u homólogos de los mismos.
- 65 10. Método según la reivindicación 7, donde el gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa es un gen *hasD* o un gen *gcaD*; u homólogos de los mismos.
11. Método según la reivindicación 7, donde el gen de glucosa-6-fosfato-isomerasa es un gen *hasE* o un homólogo del mismo.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, donde el gen o genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo(s) promotor(es) o uno(s) diferente(s) que la secuencia codificante de hialuronano sintasa.
13. Método según la reivindicación 12, donde la(s) misma(s) o diferente(s) secuencia(s) promotora(s) es un promotor tándem en el que cada promotor del promotor tándem está operativamente enlazado a la secuencia codificante de hialuronano sintasa.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el constructo de ácidos nucleicos comprende además una secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm localizada bajo la secuencia promotora y en sentido ascendente de la secuencia codificante de hialuronano sintasa.

## ES 2 360 188 T3

15. Método según la reivindicación 14, donde el constructo de ácidos nucleicos comprende además una secuencia de procesamiento/estabilizante de ARNm localizada bajo un promotor diferente o promotores diferentes del gen o genes que codifican enzimas en la biosíntesis del azúcar precursor y en sentido ascendente del gen o genes.
- 5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la célula huésped de *Bacillus* es seleccionada del grupo que consiste en *Bacillus agaradherens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.
- 10 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde el constructo de ácidos nucleicos comprende un gen de hialuronano sintasa, un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y un gen de UDP-glucosa pirofosforilasa operativamente enlazados a un promotor de "consenso" corto de *amyQ* que tiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10".
- 15 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde la célula huésped de *Bacillus* contiene un gen *cypX* y/o *yvmC* deletado o alterado .
- 20 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la primera temperatura está en la gama de 30°C-40°C.
- 25 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde el paso de cultivar a la segunda temperatura requiere al menos un 20% del total del tiempo de cultivo.
- 30 21. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, donde la segunda temperatura es suficientemente superior a la primera temperatura para permitir a la célula huésped de *Bacillus* producir ácido hialurónico con un peso molecular promedio deseado en una gama seleccionada del grupo de gamas de peso molecular que consisten en 300-350 kDa, 350-400 kDa, 400-450 kDa, 450-500 kDa, 500-550 kDa, 550-600 kDa, 600-650 kDa, 650-700 kDa, 700-750 kDa, y 750-800 kDa.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



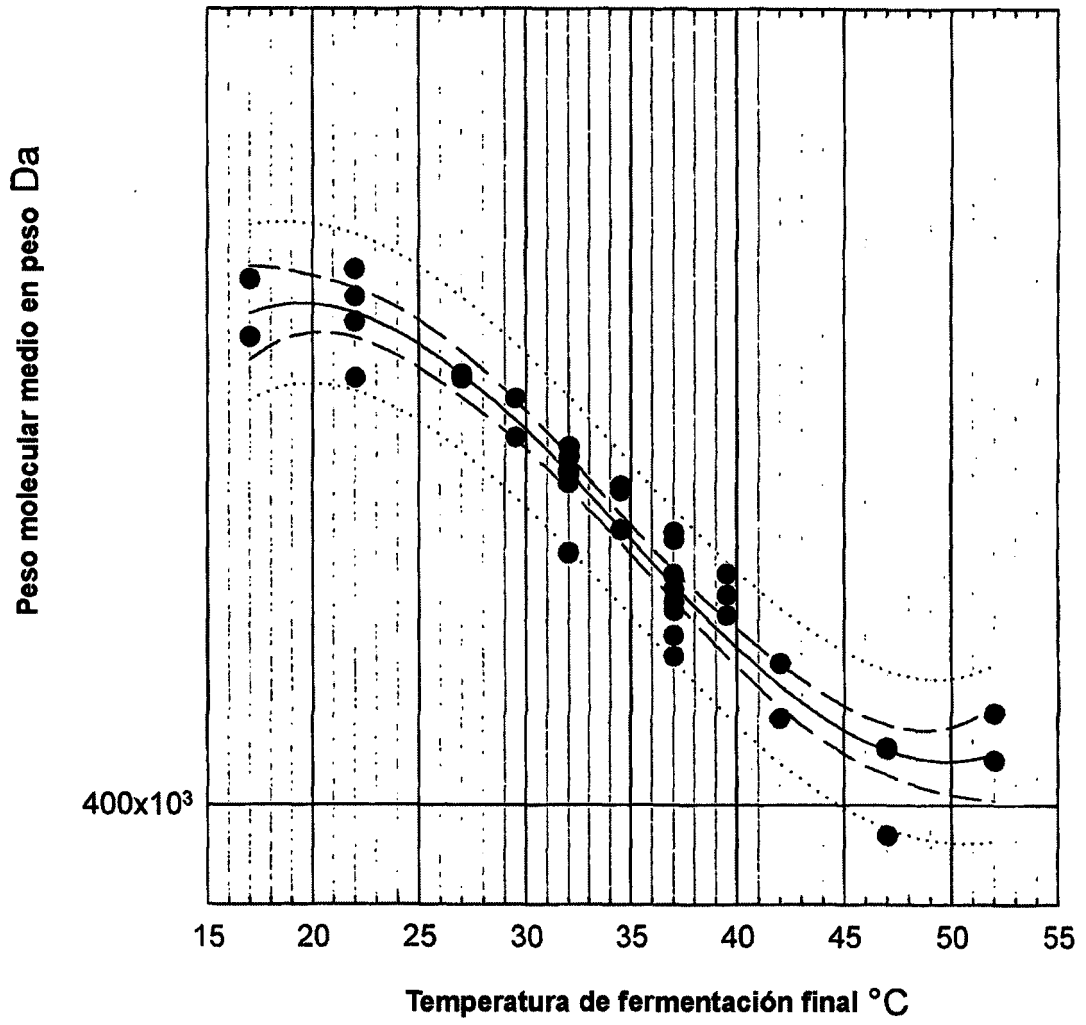


Fig. 1