

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 405**

51 Int. Cl.:  
**C12N 7/02** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06777243 .4**  
96 Fecha de presentación: **24.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1885847**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54 Título: **PROCESO DE FERMANTACIÓN ESCALABLE.**

30 Prioridad:  
**26.05.2005 EP 05011416**  
**21.07.2005 EP 05106729**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2011**

73 Titular/es:  
**CYTOS BIOTECHNOLOGY AG**  
**WAGISTRASSE 25**  
**8952 ZURICH-SCHLIEREN, CH**

72 Inventor/es:  
**EMMERLING, Marcel;**  
**HENNECKE, Frank;**  
**PFRÜNDER, Holger;**  
**RHIEL, Martin y**  
**STEINER, Philipp**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 369 405 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

Proceso de fermentación escalable

Campo de la invención

5 La presente invención hace referencia al campo de la tecnología de expresión de proteínas y fermentación. Se describe un proceso para la expresión eficiente de proteína de la cápside de bacteriófago de ARN recombinante en el huésped bacteriano. El proceso lleva a un alto rendimiento de proteína de la cápside recombinante que es capaz de formar partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) por auto-ensamblaje. Además, el proceso puede extenderse de la escala de laboratorio a volúmenes de fermentador superiores a 50 litros.

Antecedentes de la invención

10 Estrategias de vacunación recientes utilizan virus o partículas similares a virus (VLP) para mejorar la respuesta inmune hacia los antígenos. Por ejemplo, la patente WO02/056905 demuestra la utilidad de las VLP como portadoras para presentar antígenos asociados a éstas en una matriz repetitiva sumamente ordenada. Tales matrices de antígenos pueden causar una respuesta inmune potente, en particular respuestas de anticuerpos, contra el antígeno asociado e incluso son capaces de romper la tolerancia inherente del sistema inmune hacia los auto-  
15 antígenos. Por lo tanto, tales matrices de antígenos son útiles en la producción de vacunas para el tratamiento de enfermedades infecciosas y alergias y para la inducción eficiente de las respuestas inmunes auto-específicas, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, artritis reumatoide y otras enfermedades.

Como se indica en la patente WO02/056905 las proteínas de la cápside de bacteriófagos son particularmente adecuadas como portadores de antígenos. Se ha demostrado que se auto-ensamblan de manera eficiente en VLPs ante la expresión en un huésped bacteriano (Kastelein et al. 1983, Gene 23:245-254; Kozlovskaya et al. 1986, Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455). Además, las proteínas de la cápside de bacteriófagos tales como los derivados de fr (Pushko et al. 1993, Protein Engineering 6(8)883-891), Q $\beta$  (Kozlovskaya et al. 1993, Gene 137: 133-137; Cillens et al. 2000, FEBS Letters 24171:1-4; Vasiljeva et al 1998, FEBS Letters 431:7-11; Kozlovskaya et al., 1996, Intervirology 39=9-15) y MS-2 (WO92/13081 Mastico et al. 1993, Journal of General Virology 74:541-548; Hcal et al. 2000, Vaccine 18:251-258) se han producido en huéspedes bacterianos utilizando promotores inducibles tales como el promotor trp o una fusión de trp-T7 (en el caso de fr y Q $\beta$ ) o el promotor tac utilizando IPTG como sustancia inductora (en el caso de MS-2). La utilización de promotores inducibles es beneficiosa, para evitar posibles efectos tóxicos de la proteína de la cápside recombinante y la carga metabólica de la expresión de proteína que podrían ambos reducir el crecimiento del huésped de expresión bacteriana y, finalmente, el rendimiento de la proteína expresada.  
20  
25  
30

Sin embargo, los sistemas de expresión utilizados hasta el momento para la expresión de proteínas de la cápside de bacteriófagos se han aplicado en fermentaciones de pequeña escala, es decir, en escala de laboratorio y pequeños cultivos discontinuos con volúmenes normalmente menores a 1 litro. Se espera que un aumento de escala de estos sistemas que comprenden volúmenes de 50 litros y más disminuya en gran medida el rendimiento de la proteína de la cápside respectiva debido a una pérdida del promotor y/o menor retención de plásmido.  
35

Otro problema asociado con la expresión de alto nivel comercialmente deseada y rápida acumulación de proteínas de la cápside recombinantes de bacteriófagos es la formación de especies de proteína plegadas incorrectamente y la formación de los llamados cuerpos de inclusión, es decir, agregados de proteínas, que son insolubles y que pueden perjudicar otros procesos subsiguientes. Por lo tanto, para la proteína de la envoltura de bacteriófago MS-2 se ha informado sobre la formación de agregados de proteínas y de especies de proteínas que perdieron su capacidad de ensamblaje scif a VLP cuando la proteína se expresaba bajo el control del promotor T7 potente después de la inducción con IPTG utilizando el sistema de expresión pET (Peabody & Al-Bitar 2001, Nucleic Acid Research 29(22):e1113).  
40

Por lo tanto, las altas tasas de expresión de la proteína de la cápside recombinante pueden tener un impacto negativo sobre el rendimiento de las VLP ensambladas correctamente. La producción de vacunas basadas en VLPs en una escala comercial requiere, por lo tanto, el establecimiento de un proceso de fermentación eficiente y en particular escalable para la expresión de la proteína de la cápside recombinante de los bacteriófagos que llevan a un producto de calidad y pureza constantes que tiene la capacidad de auto-ensamblaje en VLPs, de este modo se minimiza o evita la formación de fracciones insolubles de la proteína de la cápside.  
45

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso para la expresión de una proteína de la cápside recombinante de un bacteriófago de ARN que evita o minimiza la desventaja o desventajas de los procesos del arte previo, y en particular, que es escalable a una escala comercial y que aún así lleva a un producto de calidad y pureza constantes y la capacidad de auto-ensamblaje a VLPs, y en donde se minimiza o evita la formación de fracción insoluble de la proteína de la cápside.  
50

## Resumen de la invención

La invención hace referencia a un proceso de expresión de una proteína de la cápside recombinante de un bacteriófago, o un mutante o fragmento de la misma capaz de formar un VLP mediante auto-ensamblaje, en donde dicho bacteriófago es un bacteriófago de ARN, y en donde dicho proceso comprende los pasos de a) introducir un plásmido de expresión en un huésped bacteriano, en donde dicho plásmido de expresión comprende un constructo de expresión, en donde dicho constructo de expresión comprende (i) una primera secuencia de nucleótido que codifica dicha proteína de la cápside recombinante, o mutante o fragmento de la misma, y (ii) un promotor que es inducible por lactosa; b) cultivar dicho huésped bacteriano en un medio que comprende una fuente de carbono principal en donde dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol, y en donde dicho cultivo se realiza en cultivo discontinuo y en condiciones bajo las cuales dicho promotor se reprime por lacl, en donde dicho lacl es sobreexpresado por dicho huésped bacteriano; c) alimentar dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal; y d) inducir dicho promotor con un inductor, en donde se continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

Esta invención proporciona un proceso de fermentación sólido para la expresión de una proteína de la cápside de un bacteriófago de ARN que forma un VLP por auto-ensamblaje, en donde el proceso es escalable a una escala de producción comercial y en donde la tasa de expresión de la proteína de la cápside lleva a un rendimiento mejorado de la proteína de la cápside soluble. Esto se logra, en particular, mediante la represión mejorada del promotor durante la fase de crecimiento y la alta retención del plásmido durante el proceso. El sistema de expresión también evita la formación de agregados de proteína insoluble limitando la tasa de expresión máxima durante la fase de producción.

En una realización preferente dicho bacteriófago de ARN se selecciona del grupo que consiste en: a) bacteriófago Q $\beta$ ; b.) bacteriófago AP205; c.) bacteriófago fr; d.) bacteriófago GA; e.) bacteriófago SP; f.) bacteriófago MS2; g.) bacteriófago M11; h.) bacteriófago M1; i.) bacteriófago NL95; j.) bacteriófago f2; k.) bacteriófago PP7 y l.) bacteriófago R17. Preferentemente, dicho bacteriófago de ARN es Q $\beta$ . Más preferentemente, dicha proteína de la cápside recombinante comprende, o de manera alternativa consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11. Aún más preferentemente, dicha proteína de la cápside recombinante comprende la SEQ ID NO:5, más preferentemente, dicha proteína de la cápside recombinante consiste en la SEQ ID NO:5.

En una realización más preferente, dicha proteína de la cápside recombinante comprende o de manera alternativa consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:14. Más preferente, dicha proteína de la cápside recombinante comprende SEQ ID NO:12, más preferente, dicha proteína de la cápside recombinante consiste en la SEQ ID NO:12.

En otra realización de la presente invención, dicho constructo de expresión comprende un primer codón finalizador, y en donde dicho primer codón finalizador es TAA, y en donde dicho TAA de manera preferente se encuentra directamente 3' de dicha primera secuencia de nucleótido.

En otra realización, dicho constructo de expresión comprende un primer codón finalizador y un segundo codón finalizador, en donde dicho primer codón finalizador se encuentra directamente 3' de dicha primera secuencia de nucleótido y en donde dicho segundo codón finalizador se encuentra directamente 3' de dicho primer codón finalizador, y en donde al menos uno de dicho primer o segundo codón finalizador es TAA.

En otra realización de dicho constructo de expresión comprende una primera secuencia de nucleótido y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica una proteína de la cápside recombinante, preferente Q $\beta$  CP, o un mutante o fragmento de la misma, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica cualquier otra proteína, preferente la proteína Q $\beta$  A1 o un mutante o fragmento de la misma, y en donde dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido están separadas por un tramo de secuencias que comprende al menos un codón finalizador TAA. En una realización preferente dicho constructo de expresión comprende o alternativamente consiste en la secuencia de nucleótido SEQ ID NO:6.

En otra realización dicho plásmido de expresión comprende o, más preferente, consiste en la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 1.

En una realización de la invención dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en el a.) promotor tac; b.) promotor trc; c.) promotor tic; d.) promotor lac; e.) promotor lacUV5, f.) promotor P<sub>syn</sub> ; g.) promotor lppa ; h.) promotor lpp-lac; i.) promotor T7-lac; j.) promotor T3-lac; k.) promotor T5-lac; y l.) un promotor que tiene al menos 50% de homología de secuencia a la SEQ ID NO:2. En una realización preferente, dicho promotor tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80, 90 ó 95%, preferente de 98 a 100%, más preferente 99% de homología de secuencia a la SEQ ID NO:2. En otra realización preferente dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor tic, promotor trc y promotor tac. Aún más preferente dicho promotor es el promotor tac. Más

## ES 2 369 405 T3

preferentemente, dicho promotor comprende o alternativamente consiste en la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:2.

En una realización, dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol, preferentemente glicerol.

5 En una realización dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial P, y en donde preferentemente dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es inferior a  $\mu_{max}$ .

En otra realización dicha inducción de dicho promotor se realiza mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, a una tasa de flujo constante.

10 En otra realización dicha inducción de dicho promotor se realiza mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, a una tasa de flujo creciente.

En otra realización dicho inductor es lactosa, en donde preferentemente dicha lactosa y dicha fuente de carbono principal se co-alimentan a dicho cultivo discontinuo en una proporción de aproximadamente 2:1 a 1:4 (w/w).

15 En otra realización dicho inductor es IPTG en donde preferentemente la concentración de dicho IPTG, dicho medio es de 0,001 a 5mM, preferentemente de 0,001 a 1mM, más preferentemente de 0,005 a 1mM, y aún más preferentemente de 0,005 a 0,5mM. En una realización muy preferente, dicha concentración de IPTG es de aproximadamente 0,01mM, más preferentemente de 0,01mM.

20 En una realización dicho *lacI* es sobreexpresado por dicho huésped bacteriano, en donde dicha sobreexpresión es provocada por *lacI<sup>q</sup>* o *lacQ1*, preferentemente por *lacI<sup>q</sup>*. En una realización dicho huésped bacteriano comprende dicho gen *lacI<sup>q</sup>* o dicho gen *lacQ1*, preferentemente dicho gen *lacI<sup>q</sup>* en su cromosoma. En otra realización preferente dicho huésped bacteriano comprende dicho gen *lacI<sup>q</sup>* o dicho gen *lacQ1*, preferentemente dicho gen *lacI<sup>q</sup>* en un plásmido, preferentemente en un plásmido de número alto de copias. En otra realización preferente dicho huésped bacteriano comprende dicho gen *lacI<sup>q</sup>* o dicho gen *lacQ1*, preferentemente dicho gen *lacI<sup>q</sup>* en dicho plásmido de expresión.

25 En una realización dicho huésped bacteriano se selecciona del grupo que consiste en las cepas E. coli RB791, E. coli DH20 y E. coli Y1088. Preferentemente dicho huésped bacteriano es E. coli RB791.

En una realización dicho huésped bacteriano comprende actividad  $\beta$ -galactosidasa.

30 En una realización dicho cultivo y dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realiza a una temperatura inferior a la temperatura de crecimiento óptima de dicho huésped bacteriano. Preferentemente, dicha temperatura se encuentra entre 23 °C y 35 °C, más preferentemente entre 25 y 33 °C, aún más preferentemente entre 27 y 32 °C, aún más preferentemente entre 28 y 31 °C. Incluso más preferentemente dicha temperatura es de alrededor de 30 °C, y más preferentemente dicha temperatura es de 30 °C.

35 En una realización dicho cultivo y dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza a una temperatura inferior a la temperatura de crecimiento óptima de dicho huésped bacteriano, en donde dicha temperatura se encuentra entre 23 °C y 35 °C, más preferentemente entre 25 y 33 °C, aún más preferentemente entre 27 y 32 °C, aún más preferentemente entre 28 y 31 °C. Incluso más preferentemente dicha temperatura es de alrededor de 30 °C, y más preferentemente dicha temperatura es de 30 °C, y dicha inducción de dicho promotor se realiza a la temperatura de crecimiento óptima del huésped bacteriano, preferentemente a aproximadamente 37°C.

40 En una realización dicho cultivo y dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realiza sin un antibiótico.

45 En una realización específica, dicho plásmido de expresión comprende o de manera alternativa consiste en la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:1, dicha fuente de carbono principal es glicerol, dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial  $\mu$  es menor a  $\mu_{max}$ , dicha inducción de dicho promotor mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo constante, en donde lactosa y glicerol son co-alimentados al cultivo discontinuo en una proporción de aproximadamente de 2:1 a aproximadamente 1:4 (w/w), preferentemente de aproximadamente de 1:1 a aproximadamente 1:4 (w/w), más preferentemente de aproximadamente 1:3 (w/w), y en donde dicho cultivo y alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realiza a una temperatura de entre 27 y 32 °C, preferentemente de aproximadamente 30 °C, más preferentemente de 30 °C.

50

En una realización específica, dicho plásmido de expresión comprende o de manera alternativa consiste en la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:30, dicha fuente de carbono principal es glicerol, dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial P, y en donde dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es inferior a  $\mu_{max}$ , dicha inducción de dicho promotor mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo constante, en donde lactosa y dicha fuente de carbono principal son co-alimentadas al cultivo discontinuo en una proporción de aproximadamente de 2:1 a aproximadamente 1:4 (w/w), preferentemente de aproximadamente de 1:1 a aproximadamente 1:4 (w/w), más preferentemente de aproximadamente 1:3 (w/w), y en donde dicho cultivo y alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realiza a una temperatura de entre 27 y 32 °C, preferentemente de aproximadamente 30 °C, más preferentemente de 30 °C.

#### Descripción de las figuras

Figura 1: Perfil de fermentación con pTac-nSD-Qb-mut (SEQ ID NO:1) en RB791 en cultivo 21. La co-alimentación durante la fase de producción se realiza con un medio que contiene 20% de glicerol y 20% de lactosa. Se muestran la concentración de glicerol [g/l] (círculos); la concentración de lactosa [g/l] (triángulos); la actividad de  $\beta$ -Gal [U/ml\*OD=1 (cuadrados) y OD<sub>600</sub> (rombos) graficados frente al tiempo del proceso [h].

#### Descripción detallada de la invención

Salvo que se definan de otra manera, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado conocido habitualmente por los expertos en el arte en el que se enmarca esta invención.

"aproximadamente": dentro del significado de la presente aplicación la expresión aproximadamente significa +/- 10%. Por ejemplo, aproximadamente 100 significa entre 90 y 110.

"promotor inducible por lactosa" se utiliza en la presente patente para hacer referencia a un promotor que comprende elementos reguladores del operón lac. Tales promotores son reprimidos por lacl y pueden ser inducidos por lactosa o el inductor sintético IPTG. Los expertos conocen que la inducción de un promotor por lactosa requiere la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en el huésped bacteriano.

"ubicado directamente 3'": una secuencia de nucleótido N2 que se encuentra directamente 3' de otra secuencia de nucleótido N1 hace referencia a una secuencia continua que tiene las conformaciones 5'-N1-N2-3' en donde N1 y N2 están directamente conectados y no separados por elementos de secuencia adicionales.

"tramo de secuencia": como se utiliza en la presente patente el término "tramo de secuencia" hace referencia a una secuencia de nucleótido continua que consiste en menos de 50, preferentemente menos de 20, más preferentemente menos de 10, y aún más preferentemente menos de 5 nucleótidos. En otra realización preferente, el tramo de secuencia comprende o de manera alternativa consiste en al menos un, y preferentemente un, codón finalizador TAA. En otra realización el tramo de secuencia comprende o de manera alternativa consiste en al menos un, preferentemente un, codón finalizador TAA y al menos un, preferentemente un, codón finalizador TGA. En otra realización preferente el tramo de secuencia comprende o de manera alternativa consiste en la SEQ ID NO:32.

"huésped bacteriano": como se utiliza en la presente patente, el término "huésped bacteriano" hace referencia a un organismo bacteriano que alberga o es capaz de albergar un plásmido de expresión de la invención, en donde "albergar" implica la replicación del plásmido de expresión y el mantenimiento del plásmido de expresión durante la división celular.

"cultivo": en el contexto de la invención un "cultivo" comprende un huésped bacteriano en un medio ("cultivo bacteriano"), en donde normalmente dicho medio soporta el crecimiento de dicho huésped bacteriano.

"cultivo discontinuo" como se utiliza en la presente patente hace referencia a un cultivo, es decir, un huésped bacteriano en un medio, en donde dicho cultivo constituye un sistema cerrado, es decir, normalmente y de manera preferente no se realiza ninguna adición ni eliminación del medio durante el tiempo de cultivo. Por lo tanto, a diferencia de un cultivo continuo, normalmente y de manera preferente la densidad del huésped bacteriano en el cultivo discontinuo aumenta de manera continua a medida que pasa el tiempo de cultivo. El cultivo discontinuo no excluye la adición de compuestos requeridos para el control del proceso, tales como, por ejemplo, inductor, oxígeno y alcali o ácido para controlar el pH.

"cultivo discontinuo alimentado": como se utiliza en la presente patente es un cultivo al que se suministra un medio adicional que comprende un sustrato, preferentemente la fuente de carbono principal del huésped bacteriano (medio de alimentación o co-alimentación). En el contexto de la aplicación este proceso se conoce como "alimentación de dicho cultivo discontinuo" (el medio comprende la fuente de carbono principal) y "co-

alimentación de dicho cultivo discontinuo" (el medio comprende la fuente de carbono principal y el inductor, preferentemente lactosa). De manera habitual y preferente, no hay ninguna eliminación de medios salvo con fines analíticos durante el tiempo de cultivo de un cultivo discontinuo alimentado.

5 "Precultivo": un cultivo, preferentemente un cultivo discontinuo, que se utiliza para producir el inóculo para un cultivo de mayor volumen, por ejemplo el cultivo en el cual se produce la proteína de la cápside recombinante (cultivo de producción). Un precultivo puede realizarse en dos o más pasos, en donde un segundo precultivo es inoculado con un primer precultivo etc. para producir un inóculo lo suficientemente grande para el cultivo de producción. El primer precultivo y/o los precultivos pueden comprender un antibiótico para mejorar la estabilidad del plásmido.

10 "sustrato": como se utiliza en la presente patente hace referencia a un compuesto en el medio de cultivo que contribuye al suministro de carbono y energía del huésped bacteriano. Por lo tanto, el término "sustrato" abarca cualquier compuesto contenido en el medio que contribuye al suministro de carbono del huésped bacteriano. Los sustratos habituales para bacterias son azúcar, almidón, glicerol, acetato y cualquier otro compuesto orgánico que puede ser metabolizado por bacteria. Por lo tanto, el término "sustrato" incluye la fuente de carbono principal pero también, por ejemplo, lactosa.

15 "Fuente de carbono principal" como se utiliza en la presente patente hace referencia al compuesto en el medio de cultivo que contribuye al suministro de carbono y energía del huésped bacteriano durante la fase de crecimiento. La fuente de carbono principal es el principal sustrato del huésped bacteriano. La fuente de carbono principal habitualmente es azúcar tal como sucrosa o glucosa, o glicerol, y preferentemente glucosa o glicerol. Aunque la lactosa podría actuar en principio como una fuente de carbono principal para un huésped bacteriano, en el contexto de la invención el término "fuente de carbono principal" habitualmente y de manera preferente no incluye lactosa.

20 Fases del proceso de la invención: El proceso de la invención se caracteriza por diferentes fases que hacen referencia a diferentes condiciones fisiológicas del huésped bacteriano con respecto a su crecimiento y el estatus de represión / inducción del constructo de expresión.

25 "Fase de crecimiento": La fase de crecimiento se inicia mediante dicho cultivo de dicho huésped bacteriano en un medio. La fase de crecimiento se caracteriza preferentemente por condiciones bajo las cuales el promotor que conduce la expresión de la proteína de la cápside recombinante es reprimido y la fase de crecimiento se termina con dicha inducción de dicho promotor con un inductor. La fase de crecimiento puede dividirse en una "fase discontinua" y una "fase de alimentación". Dicha fase discontinua se inicia mediante dicho cultivo de dicho huésped bacteriano en un medio. La fase discontinua comprende una "fase de latencia" durante la cual el huésped bacteriano todavía no crece o crece con una tasa no exponencial, habitualmente y de manera preferente una tasa lineal. La fase de crecimiento también comprende una "fase de crecimiento exponencial" que sigue directamente a la fase de latencia. No se produce alimentación de dicho cultivo durante la fase discontinua, por lo tanto, la fase de crecimiento exponencial se finaliza por el consumo del sustrato por el huésped bacteriano. La fase de crecimiento también comprende una "fase de alimentación" que sigue directamente la fase discontinua y que se inicia mediante dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal. La fase de alimentación se caracteriza por una tasa de crecimiento del huésped bacteriano que depende directamente de la tasa de flujo del medio de alimentación que contiene la fuente de carbono principal.

30 "fase de producción": Tras la fase de crecimiento sigue la fase de producción que se inicia con la inducción de dicho promotor con un inductor, en donde habitualmente y de manera preferente continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

35 "Condiciones bajo las cuales el promotor se reprime": debe entenderse que la represión de un promotor es un equilibrio de formación y disociación del complejo represor-operador y que promotores severamente reprimidos pueden mostrar cierta tasa de expresión en la ausencia de su inductor. Por lo tanto, como se usa dentro de la aplicación el término "condiciones bajo las cuales el promotor se reprime" hace referencia a condiciones, en donde al final de la fase de crecimiento, es decir, directamente antes de la adición de inductor al cultivo, la proteína de la cápside recombinante se expresa a un nivel que no excede una concentración en el medio de 200mg/l, preferentemente 150mg/l, más preferentemente 100mg/l, como se determina mediante el método HLPC del ejemplo 17. Más preferentemente, la concentración de la proteína recombinante es inferior al nivel de detección de dicho método.

40 "Inductor": dentro del significado de la invención el término "inductor" hace referencia a cualquier sustancia que interactúa directa o indirectamente con un promotor inducible y de este modo facilita una expresión de dicho promotor, por ejemplo, son inductores de "un promotor inducible por lactosa", tal como el promotor lac o tac, ITG, lactosa o alolactosa.

"Proteína de la envoltura" / "proteína de la cápside": El término "proteína de la envoltura" y el término que se utiliza de manera intercambiable "proteína de la cápside" dentro de esta aplicación, hace referencia a una proteína viral, preferentemente una subunidad de una cápside natural de un virus, preferentemente de un bacteriófago de ARN, que es capaz de ser incorporado en una cápside de un virus o un VLP. Por ejemplo, el producto del gen específico del gen de la proteína de envoltura del bacteriófago de ARN Q $\beta$  se conoce como "Q $\beta$  CP", mientras que las "proteínas de la cápside" del bacteriófago Q $\beta$  comprende el "Q $\beta$  CP" y la proteína A1.

"proteína de la cápside recombinante": Una proteína de la cápside que es sintetizada por una célula huésped recombinante.

"Polipéptido": Como se utiliza en la presente patente el término "polipéptido" hace referencia a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, generalmente residuos de aminoácidos naturales, unidos a través de enlaces péptidos. Aunque un polipéptido no necesariamente puede ser limitado en tamaño, el término polipéptido a menudo se utiliza en conjunto con péptido de un tamaño de entre diez y aproximadamente 50 aminoácidos.

"Proteína": Como se utiliza en la presente patente, el término proteína hace referencia a un polipéptido generalmente de un tamaño de más de 20, más particularmente de más de 50 residuos de aminoácidos. Las proteínas generalmente tienen una estructura tridimensional aunque no necesariamente lo necesitan, y a menudo se conocen como plegadas, a diferencia de los péptidos y polipéptidos que a menudo no tienen una estructura tridimensional, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, y se conocen como no plegados.

"Célula huésped recombinante": Como se utiliza en la presente patente, el término "célula huésped recombinante" hace referencia a una célula huésped en la cual se han introducido moléculas de ácido nucleico de la invención.

"VLP recombinante": El término "VLP recombinante", como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una VLP que se obtiene mediante un proceso que comprende al menos un paso de tecnología de ADN recombinante. El término "VLP recombinante producido", como se utiliza en la presente, hace referencia a una VLP que se obtiene mediante un proceso que comprende al menos un paso de tecnología de ADN recombinante. El término "VLP recombinante" y "VLP recombinante producido" se utilizan de manera intercambiable en la presente y tienen el mismo significado.

"Bacteriófago de ARN": Como se utiliza en la presente patente, el término "bacteriófago de ARN" hace referencia a un virus de ARN que infectan bacteria, preferentemente virus de ARN de sentido positivo y de cadena simple que infectan bacteria.

"Partícula similar a virus (VLP)": como se utiliza en la presente patente, el término "partícula similar a virus" hace referencia a una estructura similar a una partícula de virus o hace referencia a una partícula de virus no replicativa o no infecciosa, preferentemente una partícula de virus no replicativa o no infecciosa, o hace referencia a una estructura no replicativa o no infecciosa, preferentemente una estructura no replicativa o no infecciosa que se asemeja a una partícula de virus, preferentemente una cápside de un virus. El término "no replicativo", como se utiliza en la presente, hace referencia a ser incapaz de replicar el genoma que comprende la VLP. El término "no infeccioso", como se utiliza en la presente, hace referencia a ser incapaz de entrar en la célula huésped. Preferentemente, una partícula similar a virus según la invención es no replicativa y/o no infecciosa dado que carece de todo o una parte del genoma viral o una función del genoma. Habitualmente, una partícula similar a virus carece de todos o una parte de los componentes infecciosos del genoma viral. Una partícula similar a virus según la invención puede contener ácido nucleico diferente de su genoma. Una realización habitual y preferente de una partícula similar a virus según la presente invención es una cápside viral tal como la cápside viral del virus correspondiente, bacteriófago, preferentemente fago de ARN. Los términos "cápside viral" o "cápside" hacen referencia a un ensamblaje macromolecular compuesto de subunidades de proteína viral. Habitualmente, hay 60, 120, 180, 240, 300, 360 y más de 360 subunidades de proteína viral. Habitualmente y de manera preferente, las interacciones de estas subunidades llevan a la formación de la cápside viral o estructura similar a la cápside viral con una organización repetitiva inherente, en donde dicha estructura es, habitualmente, esférica o tubular. Por ejemplo, las cápsides de bacteriófagos de ARN o HBcAg tienen forma esférica de simetría icosaédrica.

"Partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN": Como se utiliza en la presente patente, el término "partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN" hace referencia a una partícula similar a virus que comprende, o de manera preferente consiste esencialmente en o que consiste en proteínas de envoltura, mutantes o fragmentos de las mismas, o en un bacteriófago de ARN. Además, la partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN que se asemeja a la estructura de un bacteriófago de ARN, que es no replicativa y/o no infecciosa, y que no tiene al menos el gen o genes que codifican la maquinaria de replicación del bacteriófago de ARN, y habitualmente que tampoco tiene el gen o genes que codifican la proteína o proteínas responsables

de la unión viral o la entrada al huésped. Las VLPs preferentes derivadas de bacteriófagos de ARN exhiben simetría icosaédrica y consiste en 180 subunidades. Un método preferente para hacer que una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN no replicativa y/o no infecciosa es la manipulación genética.

5 Uno o una, o un: Cuando los términos "uno", "una" o "un" se utilizan en esta divulgación, significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que se indique lo contrario.

10 "Identidad de la secuencia": La identidad de secuencia de aminoácidos de polipéptidos puede determinarse de manera convencional utilizando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencia, preferentemente utilizando Bestfit, para determinar si es una secuencia particular, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, los parámetros se fijan de modo tal que el porcentaje de identidad se calcula sobre todo el largo de la secuencia de aminoácidos de referencia y se permiten faltas de homología de hasta el 5% del número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia. Este método mencionado con anterioridad para determinar el porcentaje de identidad entre polipéptidos es aplicable a todas las proteínas, polipéptidos o un fragmento de los mismos divulgados en esta invención.

15 "Homología de secuencia": La homología de secuencias de nucleótidos puede por ejemplo determinarse mediante el programa blastn que es una implementación del algoritmo BLAST, preferentemente utilizando las configuraciones preestablecidas del software.

20 "Fragmento de una proteína", en particular fragmento de una proteína recombinante o proteína de envoltura recombinante, como se utiliza en la presente, se define como un polipéptido, que es al menos 70%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 90%, aún más preferentemente al menos 95% de la longitud de la proteína recombinante tipo salvaje, o proteína de la envoltura, respectivamente y que preferentemente retiene la capacidad de formar VLPs. Preferentemente, el fragmento se obtiene mediante al menos una delección interna, al menos un truncamiento o al menos una combinación de los mismos. Más preferentemente, el fragmento se obtiene mediante como máximo 10, como máximo 9, como máximo 8, como máximo 7, como máximo 6, como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o como máximo 2 delecciones internas; mediante como máximo 10, como máximo 9, como máximo 8, como máximo 7, como máximo 6, como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o como máximo 2 truncamientos; o mediante como máximo 3, preferentemente como máximo 2, más preferentemente mediante una combinación de los mismos. Más preferentemente, el fragmento se obtiene mediante al menos una delección interna, exactamente un truncamiento o al menos una combinación de los mismos.

35 El término "fragmento de una proteína recombinante" o "fragmento de una proteína de la envoltura" abarcará también un polipéptido, que tiene al menos 80%, preferentemente 90%, aún más preferentemente 95% de la identidad de secuencia de aminoácidos con el "fragmento de una proteína recombinante" o "fragmento de una proteína de la envoltura", respectivamente, como se ha definido con anterioridad y que es preferentemente capaz de ensamblarse en una partícula similar a virus.

40 El término "proteína recombinante mutante" o el término "mutante de una proteína recombinante" como se utiliza de manera intercambiable en esta invención, o el término "proteína de la envoltura" mutante" o el término "mutante de una proteína de la envoltura", como se utiliza de manera intercambiable en esta invención, hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína recombinante tipo salvaje, o proteína de la envoltura, respectivamente, en donde la secuencia de aminoácidos es al menos 80%, preferentemente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% idéntica a la secuencia tipo salvaje y preferentemente retiene la capacidad de ensamblarse a una VLP.

45 La invención hace referencia a un proceso de fermentación eficiente para la producción de una VLP de un bacteriófago de ARN. El proceso es mejorado con respecto al rendimiento de la VLP y puede hacerse a mayor escala hasta la escala de producción comercial. El proceso abarca la expresión de la proteína de la cápside recombinante de electróforos de ARN en un huésped bacteriano bajo condiciones que permiten el auto-ensamblaje de la proteína de la cápside en VLPs de manera espontánea.

50 Ejemplos específicos de VLPs que pueden producirse mediante el proceso de la invención incluyen VLPs de bacterióforos de ARN. En una realización preferente de la invención, la partícula similar a virus de la invención, comprende, esencialmente consiste en o de manera alternativa consiste en, proteínas de la envoltura recombinantes, mutantes o fragmentos de las mismas, de un fago de ARN. Preferentemente, el fago de ARN se selecciona del grupo que consiste en un a) bacteriófago  $\Phi$ ; b) bacteriófago R17; c) bacteriófago fr; d) bacteriófago GA; e) bacteriófago SP; f) bacteriófago MS2; g) bacteriófago M11; h) bacteriófago MX1; i) bacteriófago NL95; k) bacteriófago f2; l) bacteriófago PP7 y m) bacteriófago AP205.

- En una realización preferente de la invención, las VLPs se producen conteniendo proteína de la envoltura, mutantes o fragmentos de las mismas de bacteriófagos de ARN, en donde la proteína de la envoltura tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO:5 con referencia a QCP; (b) una mezcla de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:15 (proteína Q $\beta$  A1); (c) SEQ ID NO:16 (proteína de la cápside R17); (d) SEQ ID NO:17 (proteína de la cápside fr); (e) SEQ ID NO:18 (proteína de la cápside GA); (f) SEQ ID NO:19 (proteína de la cápside SP); (g) una mezcla de SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20; (h) SEQ ID NO:21 (proteína de la cápside MS2); (i) SEQ ID NO:22 (proteína de la cápside M11); (j) SEQ ID NO:23 (proteína de la cápside MX1); (k) SEQ ID NO:24 (proteína de la cápside NL95); (l) SEQ ID NO:25 (proteína de la cápside f2); (m) SEQ ID NO:26 (proteína de la cápside PP7); y (n) SEQ ID NO:12 (proteína de la cápside AP205).
- Ante la expresión en *E. coli*, usualmente se quita la metionina N-terminal de la proteína de la envoltura Q $\beta$  (Stoll, E. et al., *J. Biol. Chem.* 252:990-993 (1977)). VLP compuesta de proteínas de la envoltura Q $\beta$  donde no se ha quitado la metionina N-terminal, o VLPs que comprenden una mezcla de proteínas de la envoltura Q $\beta$  donde la metionina N-terminal se ha dividido o está presente también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.
- En una realización preferente de la invención, la VLP es una VLP mosaico que comprende o de manera alternativa consiste en más de una secuencia de aminoácidos, preferentemente dos secuencias de aminoácidos, de proteínas de la envoltura, mutantes o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago de ARN.
- En una realización muy preferente, la VLP comprende o de manera alternativa consiste en dos proteínas de la envoltura diferentes de un bacteriófago de ARN, dichas dos proteínas de la envoltura tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO:15, o de SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20.
- En realizaciones preferentes de la presente invención, la VLP producida comprende o de manera alternativa consiste esencialmente en, o de manera alternativa consiste en proteínas de la envoltura recombinantes, mutantes o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN Q $\beta$ , fr, AP205 o GA.
- En una realización muy preferente, la VLP es una VLP del fago de ARN Q $\beta$ . La cápside o partícula similar a virus de Q $\beta$  muestra una estructura de cápside similar a fago icosaédrica con un diámetro de 25nm y cuasi simetría T=3. La cápside contiene 180 copias de la proteína de la envoltura, que se unen en pentámeros covalentes y hexámeros mediante puentes de disulfuro (Golmohammadi, R. et al., *Structure* 4:543-5554 (1996)).
- Partículas similares a virus preferentes de bacteriófagos de ARN, en particular de Q $\beta$  y fr según esta invención como se divulga en WO 02/056905, cuya divulgación se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. En particular el ejemplo 18 de WO 02/056905 proporciona una descripción detallada de la preparación de partículas VLP de Q $\beta$ .
- En otra realización muy preferente, la VLP es una VLP del bacteriófago de AP205. Formas mutantes competentes para el ensamblaje de VLP AP205, incluyendo la proteína de la envoltura AP205 con la sustitución de prolina en el aminoácido 5 a treonina, también puede utilizarse en la práctica de la invención y lleva a otras realizaciones preferentes de la invención. WO 2004/007538 describe, en particular en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, cómo obtener VLP que comprende proteínas de la envoltura AP205, y de este modo en particular la expresión y la purificación para las mismas. WO 2004/007538 se incorpora a la presente a modo de referencia.
- En una realización preferente, la VLP comprende o consiste en una proteína de la envoltura mutante de un bacteriófago de ARN, en donde la proteína de la envoltura mutante ha sido modificada mediante la eliminación de al menos un residuo de lisina a través de la sustitución y/o a través de la delección. En otra realización preferente, la VLP de la invención comprende o consiste en una proteína de la envoltura mutante de un bacteriófago de ARN, en donde la proteína de la envoltura mutante ha sido modificada mediante la adición de al menos un residuo de lisina a través de la sustitución y/o a través de la inserción. La delección, sustitución o adición de al menos un residuo de lisina permite variar el grado de acoplamiento con un antígeno.
- VLPs o cápsides de la proteína de la envoltura Q $\beta$  muestran un número definido de residuos de lisina en su superficie, con una topología definida con tres residuos de lisina que apuntan hacia el interior de la cápside e interactúan con el ARN y cuatro otros residuos de lisina expuestos al exterior de la cápside.
- Mutantes de Q $\beta$  cuyos residuos de lisina se reemplazan mediante argininas también engloban dentro de la presente invención. Preferentemente, estas proteínas de la envoltura mutantes comprenden o de manera alternativa consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de a) Q $\beta$ -240 (SEQ ID NO:7, Lys13→Arg); b) Q $\beta$ -243 (SEQ ID NO:8, Asn14→Lys); c) Q $\beta$  -250 (SEQ ID NO:9, Lys2→Arg); d) Q $\beta$  -251 (SEQ ID NO:10, Lys16→Arg); y e) Q $\beta$ -259 (SEQ ID NO:11, Lys2→Arg, Lys16→Arg). La construcción, expresión y purificación de las proteínas de la envoltura mutantes Q $\beta$ , VLP de la proteína de la envoltura mutante QP y cápsides, respectivamente, se describen en WO02/056905. En particular, se hace referencia en la presente al Ejemplo 18 de la aplicación mencionada con anterioridad.

En otra realización preferente la proteína de la cápside recombinante es una proteína de la cápside del bacteriófago AP205 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:12 o una mutación de la misma, que es capaz de formar un VLP, por ejemplo las proteínas AP205PST (SEQ ID NO:13) o AP205 N14D (SEQ ID NO:14.).

5 En una realización muy preferente dicha proteína de la cápside recombinante está compuesta por la proteína de la envoltura C de 133 aminoácidos del bacteriófago de ARN Q $\beta$  que infecta la E. coli que comprende o preferentemente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:5, en donde preferentemente dicha proteína de la cápside recombinante es capaz de formar una VLP por auto-ensamblaje.

10 En una realización, dicho constructo de expresión comprende un primer codón finalizador y un segundo codón finalizador, en donde dicho primer codón finalizador se encuentra directamente 3' de dicha primera secuencia de nucleótido y en donde dicho segundo codón finalizador se encuentra directamente 3' de dicho primer codón finalizador, y en donde al menos uno de dicho primer o segundo codón finalizador es TAA. Por ejemplo, el plásmido pTac-nSDAP205 (SEQ ID NO:30) comprende el codón finalizador TAA natural como un primer codón finalizador y un codón finalizador TGA adicional directamente 3' del primer codón finalizador.

15 En una realización preferente el constructo de expresión comprende una primera secuencia de nucleótido y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica una proteína de la cápside recombinante, preferentemente Q $\beta$  CP, o un mutante o fragmento de la misma, más preferentemente SEQ ID NO:5, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica cualquier otra proteína, preferentemente la proteína Q $\beta$  A1 o un mutante o fragmento de la misma, más preferentemente SEQ ID NO:15, y en donde dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótido están separadas por un tramo de secuencias que comprende al menos un codón finalizador TAA. En una realización dicho codón finalizador TAA es generado reemplazando el codón finalizador natural, preferentemente TGA por la secuencia TAA. De manera alternativa y más preferentemente, dicho codón finalizador TAA es generado reemplazando el codón finalizador natural, preferentemente TGA por la secuencia TAATGA (SEQ ID NO:32).

25 Por ejemplo, la región del gen C Q $\beta$  corresponde a NCBI GenBank Acc. N° M99039 (nucleótidos 46-1062). El gen C contiene una primera secuencia de nucleótido que codifica la proteína de la envoltura de 133 aminoácidos Q (SEQ ID NO:5) y una segunda secuencia de nucleótido que codifica la proteína A1 ultraleída de 329 aminoácidos (SEQ ID NO:15). Los nucleótidos 1-399 de SEQ ID NO:6 (nucleótidos 46- 444 de NCBI GenBank Acc. N° M99039) corresponden a dicha primera secuencia de nucleótido que codifica la QCP de 133 aminoácidos, los nucleótidos 30 400 a 402 de SEQ ID NO:6 corresponden al codón finalizador TAA potente y los nucleótidos 403 a 405 de SEQ ID NO:6 al codón finalizador TGA permeable, que es seguido de dicha segunda secuencia de nucleótido QCA1). De manera sorprendente, se encontró que la presencia de la secuencia de nucleótido que rota a A1 en el constructo de expresión da como resultado mayor estabilidad de ARN y, por lo tanto, en rendimiento mejorado de QCP y VLP comparado con un constructo en donde la secuencia A1 es borrada.

35 La expresión de una proteína recombinante puede reducir de manera significativa la tasa de crecimiento del huésped bacteriano debido a efectos tóxicos de la proteína que se acumula y debido a la carga metabólica causada por la síntesis de proteínas. En particular puede ocurrir la lisis celular y baja retención de plásmido. Los promotores inducibles proporcionan la posibilidad de separar la fase de crecimiento de la fase de producción de un proceso de fermentación. Los promotores inducibles son reprimidos por una molécula represora durante la fase de crecimiento 40 del huésped bacteriano y son inducidos mediante la exposición del huésped bacteriano a condiciones inductivas durante la fase de producción. Por lo tanto, los promotores inducibles permiten que el huésped bacteriano crezca rápido, preferentemente de manera exponencial durante la fase de crecimiento y alcance altas densidades celulares. Por lo tanto, los promotores inducibles proporcionan alto rendimiento del producto de expresión al final de la fase de producción. Por lo tanto, se prefiere la utilización de promotores inducibles para la expresión de la proteína 45 recombinante.

Un ejemplo conocido para un promotor inducible es el promotor lac que forma parte del operón lac y que puede ser inducido mediante adición de lactosa o el inductor sintético potente isopropiltio  $\beta$ -D-galactósido (IPTG) al medio de crecimiento del huésped bacteriano. Donovan et al. 2000 (Can. J. Microbiol 46:532-541) informa sobre un proceso mejorado para la expresión de un fragmento de anticuerpo monoclonal bajo el control del promotor lac. Otros 50 ejemplos de promotores inducibles se proporcionan en la tabla 1 de Makrides 1996 (Microbiological Reviews, p. 512-538).

Una desventaja habitual de los sistemas de expresión basados en promotores inducibles es la "permeabilidad" del promotor, lo cual significa que el promotor sólo se reprime de modo insuficiente y causa una tasa de expresión de la proteína recombinante durante la fase de crecimiento. Habitualmente esto lleva a una densidad celular reducida o a 55 inestabilidad de plásmido y, como consecuencia, a un rendimiento reducido de la proteína recombinante Makrides 1996 (Microbiological Reviews, p. 512-538). Un ejemplo de un promotor que es propenso a represión insuficiente es el promotor Vhb que se reprime bajo condiciones de oxígeno alto e inducido ante la depleción de oxígeno.

Para los fines de la invención, son preferentes los promotores que son severamente reprimidos. En una realización, el promotor se reprimido por el represor lacl. Se revelan ejemplos de tales promotores en Makrides 1996 (Microbiol. Rev. 60:512-538), Goldstein & Doi 1995 (Biotechnology Annual Review 1:105-128), Hannig & Makrides 1998 (TIBTECH 16:54-60) y Stevens 2000 (Structures 8, R177-R185). En una realización preferente, el promotor es inducible por lactosa, más preferentemente se selecciona del grupo que consiste en lac, lacUV5, tac, trc, Psyn, lppa, lpp-lac, T7-lac, T3-lac, y T5-lac. Es especialmente preferente para el fin de la invención el promotor tac (SEQ ID NO:2) o una mutación o variante del mismo. Dentro del alcance de la invención se encuentran mutantes o variantes truncadas o alteradas del promotor tac que tiene la homología de secuencia con SEQ ID NO:2 que es al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80, 90, o 95%, preferentemente de 98 a 100 %, más preferente 99 %. En donde la potencia del promotor de tal variante mutada, truncada o alterada es comparable a la del promotor de la SEQ ID NO:2. Los expertos podrán determinar la potencia del promotor de una secuencia dada mediante estudios de expresión comparativa utilizando métodos estándares. En una realización específica de la invención el promotor que dirige la expresión de la proteína de la cápside recombinante comprende o de manera alternativa consiste en la SEQ ID NO:2. El promotor tac es un producto de fusión de la región -10 del promotor lacUV5 y la región -35 del promotor trp y combina la alta eficiencia de transcripción del trp con los elementos regulatorios del promotor lac (dc Boer et al. 1983, PNAS 80:21-25; Amann et al. 1983 Gene 25:167-178). Proporciona tasas de expresión lo suficientemente altas y alto rendimiento de proteína mientras evita la formación de proteína recombinante insoluble o plegada de manera incorrecta que puede ocurrir con promotores más potentes, tales como el promotor T7. Los promotores trc y tic son versiones mutadas del promotor tac (Brosius et al. 1985, The Journal of Biological Chemistry 260(6):3539-3541). En otra realización preferente el promotor se selecciona del grupo que consiste en tic, trc y tac.

Para la construcción de un constructo de expresión para los fines de la invención el promotor está unido a dicha primera secuencia de nucleótido que codifica la proteína de la cápside a través del sitio de unión de ribosoma (Secuencia Shine-Dalgarno, SD), que habitualmente comprende un codón finalizador ATG al extremo 3'. Las secuencias Shine-Dalgarno adecuadas para los fines de la invención son conocidas en el arte (Dalbøge et al. 1988, DNA 7(6):399-405; Ringquist et al. 1992, Mol. Micr. 6:1219-1229). En una realización de la invención el constructo de expresión comprende la secuencia SD de Dalbøge et al. 1988 (DNA 7(6):399-405) que se muestra en SEQ ID NO:4. En otra realización preferente el constructo de expresión comprende una secuencia Shine-Dalgarno de Ringquist et al. 1992 (Mol. Micr. 6:1219-1229, SEQ ID NO:3, nSD). De manera sorprendente, se encontró que SEQ ID NO:3 es particularmente apropiada para los fines de la invención dado que resulta en niveles de expresión mejorados y rendimiento mejorado de la proteína de la cápside recombinante. SEQ ID NO:3 es especialmente adecuada para mejorar la expresión de la proteína de la cápside AP205. En una realización preferente de la invención el constructo de expresión comprende una secuencia de Shine-Dalgarno seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, preferentemente dicha secuencia de Shine-Dalgarno es SEQ ID NO:3.

Los terminadores transcripcionales son elementos funcionales de los constructos de expresión. El experto podrá elegir una secuencia finalizadora adecuada de una gran variedad de fuentes. En una realización preferente de la invención dicho constructo de expresión comprende una secuencia finalizadora, en donde preferentemente, dicha secuencia finalizadora está unida a dicha primera secuencia de nucleótido, en donde preferentemente dicha secuencia finalizadora es la secuencia finalizadora rRNB, más preferentemente SEQ ID NO:28.

A los fines de la selección de plásmido un experto habitualmente utilizará un gen marcador de resistencia a antibióticos. Son ejemplos de genes con resistencia a antibióticos que se utilizan ampliamente en el arte y que son adecuados para los fines de la invención genes de resistencia contra los antibióticos ampicilina, tetraciclina y kanamicina. La utilización de kanamicina como agente selectivo en el marco de un proceso para la producción de una VLP generalmente es preferente debido al inferior potencial alergénico de kanamicina comparado con antibióticos alternativos y debido a menores problemas de seguridad que se derivan del mismo para la utilización de la VLP como vacuna. Además, kanamicina proporciona mejor retención de plásmido comparada con antibióticos alternativos tales como ampicilina. El gen kanamicina 3'-fosfotransferasa (SEQ ID NO:29) que se deriva del transposón Tn903 es, por lo tanto, un gen marcador seleccionable particularmente útil.

La adición de antibióticos al medio generalmente no es deseable en un proceso de producción comercial por razones de costes y seguridad. En el contexto de la invención, antibióticos, preferentemente kanamicina, habitualmente y de manera preferente se utilizan para la selección de la cepa de expresión. El medio utilizado en el proceso de producción esencialmente no contiene antibióticos, en particular kanamicina. Sin embargo, la adición de un antibiótico a precultivos utilizados para producir el inóculo para el cultivo de producción puede mejorar la retención de plásmido en todo el proceso (Ejemplo 10).

Un experto creará plásmidos de expresión que comprendan constructos de expresión que sean útiles para la producción de VLP de bacteriófagos mediante la combinación de los elementos genéticos descritos con anterioridad aplicando métodos estándares de biología molecular. Son plásmidos de expresión particularmente útiles para los fines de la invención pTac-nSDQb-mut (SEQ ID NO:1) para la producción de Q $\beta$  VLP y pTac-nSDAP205 (SEQ ID NO:30) para la producción de AP205 VLP. La construcción de estos plásmidos de expresión específicos se describe en detalle en la sección Ejemplos.

Los plásmidos de expresión se transforman a un huésped de expresión bacteriana mediante cualquier método conocido en el arte, preferentemente por electroporación. Los clones individuales del huésped que comprenden el plásmido de expresión se seleccionan por la máxima expresión de la proteína de la cápside recombinante mediante SDS-PAGE después de la lisis celular. Los clones seleccionados del huésped de expresión que comprenden el plásmido de expresión pueden almacenarse como cultivos de glicerol congelados.

Dicho huésped bacteriano puede ser seleccionado de cualquier cepa bacteriana capaz de replicar y mantener dicho plásmido de expresión durante la división celular. Los huéspedes bacterianos preferentes son cepas de *Escherichia coli* que tienen las características específicas descritas en las siguientes secciones.

La represión del promotor es mejorada por la sobreexpresión del represor por el huésped bacteriano. En una realización dicho cultivo de dicho huésped bacteriano se realiza en cultivo discontinuo y bajo condiciones en las cuales dicho promotor es reprimido por *lacI*. En una realización preferente, el gen que causa la sobreexpresión de dicho *lacI* en dicho huésped bacteriano se encuentra en un plásmido, preferentemente en dicho plásmido de expresión. De manera alternativa, dicho gen se encuentra en un plásmido separado contenido en dicho huésped bacteriano, en donde dicho plásmido separado es preferentemente un plásmido de número alto de copias. De manera alternativa, y más preferentemente, dicho gen se encuentra en el cromosoma de dicho huésped bacteriano.

Un ejemplo de un gen que causa la sobreexpresión de *lacI* es *lacI<sup>q</sup>* (Menzella et al. 2003, *Biotechnology and Bioengineering* 82(7):809-817) que es un solo cambio de CG aTA a -35 de la región del promotor de *lacI* que causa un aumento de 10 en la expresión de *LacI*. Otro ejemplo es *lacIQ1* (Glascok & Weickert 1998, *Gene* 223(1-2):221-231). La represión mejorada del promotor durante la fase de crecimiento da como resultado una retención de plásmido mejorada y mayor densidad celular y, finalmente, mejor rendimiento de la proteína. Por ejemplo, las cepas bacterianas que comprenden el gen *lacI<sup>q</sup>* sobreexpresan a la molécula represora de *lacI* y por lo tanto previenen la formación de la proteína recombinante durante la fase de crecimiento de manera más eficiente que las cepas que comprenden el gen tipo salvaje. En una realización preferente el gen que causa la sobreexpresión de dicho *lacI* es *lacIQ1* o *lacI<sup>q</sup>*, preferentemente *lacI<sup>q</sup>*. En una realización específicamente preferente dicho huésped bacteriano comprende el gen *lacI<sup>q</sup>* en su cromosoma.

En una realización dicha inducción de dicho promotor se realiza con un inductor, en donde dicho inductor se selecciona preferentemente de IPTG y lactosa, más preferentemente dicho inductor es lactosa. Ante la exposición del huésped bacteriano a un inductor, el represor es inactivado y el promotor se vuelve activo. La adición del inductor IPTG potente al medio de cultivo produce un aumento inmediato de la tasa de expresión de la proteína recombinante a un alto nivel porque IPTG entra directamente en las células por difusión y se une y desactiva el represor activo *lacI*. Las moléculas represoras *lacI* desactivadas son disociadas del operador y permiten un alto nivel de transcripción del promotor. IPTG no es metabolizado por la célula y la transcripción continúa con altas tasas hasta que otros parámetros metabólicos se vuelven restrictivos.

Como se indica con anterioridad, las altas tasas de expresión pueden llevar a la formación de proteína recombinante insoluble que no es capaz de formar una VLP por auto-ensamblaje. La inducción de expresión de proteína con altas concentraciones de IPTG es particularmente propensa a la formación de proteína insoluble. Por lo tanto, la inducción del promotor se activa preferentemente mediante la adición de IPTG en concentraciones que son inferiores a la concentración que hace que se produzca la expresión a su tasa máxima (Kopetzki et al. 1989, *Mol Gen Genet* 216:149-155).

En una realización preferente dicha inducción de dicho promotor se realiza con IPTG, en donde la concentración de dicho IPTG en dicho medio es de aproximadamente 0,001 a 5mM, preferentemente de 0,001 a 1mM, más preferentemente de 0,005 a 1mM, y aún más preferentemente de 0,005 a 0,5mM. En una realización especialmente preferente, la concentración de IPTG es de aproximadamente 0,01mM, más preferentemente de 0,01mM.

De manera alternativa, la inducción del promotor se logra mediante la adición de lactosa. La inducción de la expresión de proteína recombinante con lactosa requiere que el huésped bacteriano sea capaz de captar lactosa del medio, por ejemplo mediante *Lac* permeasa y que comprenda actividad  $\beta$ -galactosidasa. A la captación de lactosa en las células dependiente de *Lac* permeasa le sigue una cinética más lenta que la captación de IPTG por difusión. Además, la lactosa no interactúa directamente con el operón *lac* sino que es convertida por  $\beta$ -galactosidasa en alolactosa (1-6-O  $\beta$ -galactopiranosil-D-glucosa) que es el inductor real del promotor. La inducción de la expresión de proteína recombinante por la adición de lactosa es ventajosa porque evita el aumento inmediato de la tasa de expresión a un nivel máximo ante la adición del inductor y, por lo tanto, reduce el riesgo de formación de proteína insoluble.

La alolactosa es metabolizada por el huésped bacteriano durante la fase de producción y contribuye con carbono y energía metabólica al metabolismo bacteriano. Esto también puede contribuir a mejorar el rendimiento de proteína en comparación con la inducción con IPTG. Además, la inducción por lactosa permite hasta un cierto punto extender el control de la tasa de expresión de la proteína recombinante durante la fase de producción mediante la concentración de lactosa en el medio. La inducción por lactosa es preferente en el proceso de producción

farmacéutica porque IPTG es costoso y se cree que es tóxico. Su eliminación necesita demostrarse al final del proceso de producción.

5 En una realización preferente dicha inducción de dicho promotor se realiza mediante la adición de lactosa a dicho cultivo discontinuo, en donde preferentemente dicho huésped bacteriano es capaz de captar la lactosa del medio y en donde también preferentemente dicho huésped bacteriano comprende actividad  $\beta$ -galactosidasa. Tales cepas de bacteria pueden, por ejemplo, obtenerse de colecciones de cepas tales como ATCC (<http://www.atcc.org>).  
 10 En una realización preferente, dicho huésped bacteriano es una cepa de E. coli, preferentemente una cepa de E. coli seleccionada del grupo que consiste en RB791, DH20, Y1088, W3110 y MG1655. Más preferentemente, dicho huésped bacteriano es E. coli RB791. En una realización aún más preferente, dicho promotor es el promotor tac o mutante o variante del mismo y dicho huésped bacteriano es una cepa de E. coli que también comprende un gen que causa la sobreexpresión de un represor del promotor tac, en donde dicho gen es preferentemente lacI<sup>q</sup>. El pH del medio de cultivo del huésped bacteriano puede ser controlado durante el proceso de fermentación y regulado mediante la adición de soluciones ácidas o alcalinas utilizando métodos conocidos en el arte. En una realización,  
 15 dicho cultivo de dicho huésped bacteriano y dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza bajo condiciones, en donde el pH del medio es controlado. En una realización preferente, dicho pH se encuentra entre 5,5 y 8,0; más preferentemente entre 6,5 y 7,5; aún más preferentemente entre 6,7 y 7,0 y todavía más preferentemente dicho pH de dicho medio es 6,8. Dicho pH de dicho medio puede mantenerse constante durante el proceso o puede seguir un perfil durante las diferentes fases del proceso dentro de los rangos de pH especificados con anterioridad. En una realización preferente dicho pH se mantiene constante a un valor de 6,7 a 7,0, preferentemente dicho pH se  
 20 mantiene constante a 6,8.

El proceso de la invención comprende una fase de crecimiento, en donde dicha fase de crecimiento comprende una fase discontinua y una fase de alimentación, en donde dicha fase de crecimiento y simultáneamente dicha fase discontinua son iniciadas por dicho cultivo de dicho huésped bacteriano y en donde dicha fase de alimentación se inicia mediante dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

25 La capacidad oxidativa de las células de bacterias se ve limitada y altas concentraciones del sustrato pueden causar la formación de productos reducidos como acetato, que puede llevar a la acidificación no deseada del medio y al crecimiento reducido de bacterias. Por lo tanto, el huésped bacteriano crece en un cultivo discontinuo alimentado en un medio mínimo con una cantidad limitada de sustrato. En una realización, dicho cultivo de dicho huésped bacteriano se realiza en un medio que comprende una fuente de carbono principal, en donde dicho medio es preferentemente un medio mínimo, preferentemente un medio mínimo definido químicamente. Más preferentemente,  
 30 dicho medio es un medio R27 como se describe en el Ejemplo 5.

Al final de la fase discontinua, cuando el sustrato contenido en el medio está casi agotado, el medio que contiene la fuente de carbono principal (medio de alimentación) es proporcionado a dicho cultivo discontinuo a la misma tasa que la tasa de crecimiento deseada para el huésped bacteriano, es decir, la tasa de crecimiento del huésped  
 35 bacteriano es limitada por la tasa de alimentación del sustrato. Un experto entenderá que el parámetro decisivo es el flujo de masa real del sustrato, preferentemente la fuente de carbono principal, y otros nutrientes requeridos para mantener el crecimiento. Dado que en la práctica puede asumirse una composición constante del medio de alimentación, la tasa de flujo hace referencia al flujo de volumen del medio. La misma concentración se aplica al medio de co-alimentación (véase a continuación).

40 Por lo tanto, en una realización dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo limita la tasa de crecimiento de dicho huésped bacteriano.

45 Durante la fase de alimentación la tasa de crecimiento puede seleccionarse libremente en un rango amplio de casi hasta la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ) si no se produce inhibición alguna. El valor real de  $\mu_{\max}$  depende en gran medida de la cepa bacteriana, el constructo de expresión y las condiciones de crecimiento. Un experto comprenderá que la determinación de  $\mu_{\max}$  se realiza bajo condiciones bajo las cuales se reprime el promotor.

50 Para un experimento dado,  $\mu$  puede determinarse a partir de la curva de crecimiento del cultivo mediante el trazado de concentración de biomasa ( $x$ ) determinada por OD<sub>600</sub> o el peso húmedo celular (CWW, por sus siglas en inglés) frente al tiempo de cultivo y la determinación del coeficiente de crecimiento exponencial  $\mu$  en base a la ecuación  $x = x_0 e^{\mu t}$ . El valor real de  $\mu_{\max}$  se determina como la tasa de crecimiento  $\mu$  de un cultivo discontinuo exponencialmente creciente en el comienzo de la fase discontinua cuando no se produce limitación de sustrato, es decir, sin suministro de un medio adicional por alimentación. La tasa de crecimiento  $\mu$  puede determinarse calculando la relación entre la diferencia entre logaritmo natural de la biomasa total  $X_2$  medido en el momento  $t_2$  y el logaritmo natural de la biomasa total  $X_1$  medido en el momento  $t_1$ :  $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$ .

55 El cultivo discontinuo alimentado permite el mantenimiento de una tasa de crecimiento constante ( $\mu$ ). En una realización preferente, el sustrato, preferentemente la fuente de carbono principal, se alimenta durante la fase de alimentación según el incremento exponencial de la biomasa ( $x$ ). Si durante la fase de alimentación el sustrato se

5 suministra a la misma tasa que se consume, el cultivo se encuentra en un estado casi estable, análogo al cultivo en un cultivo continuo. Dado que la formación de biomasa y consumo de sustrato guardan correlación en cuanto al coeficiente de rendimiento referente al sustrato  $Y_{x/s}$  (biomasa [g] / sustrato [g]), la cantidad(es) de sustrato por unidad de tiempo (t) a ser suministrada se calcula según la fórmula  $ds/dt = \mu/Y_{x/s} X_{0\ tot} e^{\mu t}$ , en donde  $X_{0\ tot}$  es la biomasa total al comienzo de la alimentación.

10 Por lo tanto, en una realización preferente dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial  $\mu$ , y en donde preferentemente dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es inferior a  $\mu_{max}$ . Por lo tanto, la tasa de crecimiento de dicho huésped bacteriano durante la fase de alimentación se fija a un valor por debajo de  $\mu_{max}$ . En una realización preferente dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es de aproximadamente de 30 % a 70 %, más preferente es de aproximadamente 50 % de  $\mu_{max}$ . En una realización específica de la invención  $\mu$  se fija en un valor absoluto de 0,15 a 0,45  $h^{-1}$ , más preferentemente de 0,25 a 0,35  $h^{-1}$ , aún más preferentemente  $\mu$  es 0,3  $h^{-1}$ , siempre que la configuración del proceso sea tal que estos valores se encuentren por debajo de  $\mu_{max}$ .

15 Las bacterias pueden utilizar una gran variedad de sustratos diferentes. Para los fines de la invención, son fuentes de carbono principal preferentes glucosa y glicerol, preferentemente glicerol. Aunque la tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_{max}$ ) del huésped de expresión que puede lograrse puede ser mayor con glucosa que con glicerol, el glicerol produce menos formación de acetato y proporciona mayor rendimiento de biomasa por sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y, eventualmente, mayor rendimiento de la proteína recombinante. Además, el manejo del glicerol de sustrato líquido es más sencillo que el de fuentes de carbono sólidas como glucosa que necesitan disolverse en un paso separado del proceso.

20 Como se menciona con anterioridad, la retención de plásmido, es decir, el mantenimiento del plásmido de expresión en el huésped bacteriano durante el proceso de fermentación, es fundamental para el óptimo rendimiento de la proteína recombinante. La retención de plásmido puede evaluarse mediante la distribución de células de bacterias en un medio sólido para formar colonias individuales y la evaluación de las colonias individuales de prueba para determinar su resistencia a antibióticos. Por ejemplo, una retención de plásmido del 100 % significa que 100 de 100 colonias evaluadas comprenden la resistencia a antibióticos específica que es proporcionada por el plásmido de expresión. Para los fines de la invención, la retención de plásmido al final del proceso de fermentación es superior al 80 %, preferentemente superior al 90 %, más preferentemente superior al 95 %, aún más preferentemente superior al 97 % y más preferentemente es del 100 %.

25 30 La temperatura de crecimiento óptima de una cepa bacteriana es la temperatura a la cual alcanza su tasa de crecimiento máxima más alta ( $\mu_{max}$ ). Bajo condiciones de otro modo no limitativas para la mayoría de las cepas de E. coli esta temperatura es de 37°C. Sin embargo, el crecimiento de la cepa bacteriana comprende el constructo de expresión a la temperatura de crecimiento óptima y en ausencia de un antibiótico selectivo puede favorecer la pérdida del plásmido de expresión, mientras que la retención del plásmido generalmente es mejorada cuando la cepa de expresión crece a temperatura ambiente. Aunque la tasa de crecimiento máxima de la cepa de expresión es menor cuando la cepa crece a temperaturas inferiores a su temperatura de crecimiento original en comparación a la temperatura de crecimiento óptima, el rendimiento de la proteína recombinante puede ser igual o incluso mejor a la temperatura inferior debido a la mejor retención de plásmido.

35 40 45 En una realización de la invención, dicho cultivo de dicho huésped bacteriano y/o dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal y/o dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza por lo tanto a una temperatura inferior a la temperatura de crecimiento óptima de dicho huésped bacteriano. En una realización preferente, dicha temperatura se encuentra entre 20°C y 37 °C, preferentemente entre 23 y 35 °C, más preferentemente entre 25 y 33 °C, aún más preferentemente entre 27 y 32 °C, aún más preferentemente entre 28 y 31°C. Incluso más preferentemente dicha temperatura es de alrededor de 30 °C, y más preferentemente dicha temperatura es de 30 °C.

El proceso de la invención comprende una fase de producción, en donde dicha fase de producción se inicia mediante dicha inducción de dicho promotor con un inductor. El punto en el tiempo para el comienzo de dicha fase de producción puede determinarse en base a parámetros del tiempo de cultivo y/o de crecimiento.

50 55 El crecimiento del huésped bacteriano durante el proceso de fermentación puede evaluarse determinando la densidad óptica a 600nm ( $OD_{600}$ ), el peso húmedo celular (CWW [g/l]) y el peso seco celular (CDW [g/l]). Estos parámetros pueden utilizarse para definir el momento óptimo para el comienzo de la fase de producción mediante la adición del inductor, preferentemente lactosa, al medio. Es evidente para los expertos que por un lado un mayor CWW al comienzo de la fase de producción puede lograrse mediante una fase de alimentación extendida y puede llevar a un rendimiento mejorado de la proteína recombinante, pero por otro lado cultivos sobre- madurados pueden tener expresión de proteína insuficiente. El momento óptimo para comenzar la fase de producción, que comienza mediante dicha inducción de dicho promotor con un inductor, por lo tanto, necesita determinarse para las condiciones de producción específicas. Por ejemplo, para la expresión de  $\lambda$ CP en E. coli RB791 en un volumen total de 2 l, la inducción comienza después de aproximadamente 14 h, cuando  $OD_{600}$  alcanzó aproximadamente 40

a 60. De manera sorprendente, se encontraron parámetros similares para el mismo proceso en una escala 501, donde la inducción también comienza después de aproximadamente 14 horas cuando OD<sub>600</sub> alcanzó aproximadamente 50.

5 Por lo tanto, en una realización de la invención, dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza de 10 a 16 horas después de comenzar dicha fase de crecimiento, preferentemente después de 12 a 15 horas, más preferentemente de 13 a 15 horas, más preferentemente después de 14 horas, en donde preferentemente dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza cuando OD<sub>600</sub> alcanzó aproximadamente de 40 a 60, preferentemente alrededor de 50.

10 En otra realización, dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza después de una fase de alimentación extendida, en donde preferentemente dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza de 14 a 20 horas después de comenzar dicho cultivo de dicho huésped bacteriano en un medio, preferentemente de 15 a 18 horas, más preferentemente de 16 a 17 horas, más preferentemente después de aproximadamente 16,5 horas, en donde preferentemente dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza cuando OD<sub>600</sub> alcanzó aproximadamente de 80 a 90, preferentemente alrededor de 85.

15 En una realización de la invención, dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza cuando OD<sub>600</sub> alcanzó un valor de 25 a 60, preferentemente de 25 a 55, más preferentemente de 30 a 50, más preferentemente de 30 a 40. En una realización específicamente preferente dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza cuando OD<sub>600</sub> es 35.

20 En otra realización de la invención, dicha inducción de dicho promotor con dicho inductor se realiza después de una fase de alimentación extendida, cuando OD<sub>600</sub> alcanzó un valor de 60 a 120, preferentemente de 70 a 110, más preferentemente de 80 a 100, más preferentemente de 80 a 90. En una realización específicamente preferente la inducción comienza después y una fase de alimentación extendida cuando OD<sub>600</sub> es de alrededor de 85, preferentemente 85.

25 Inducción con IPTG: En una realización de la invención dicha inducción de dicho promotor con un inductor se logra mediante una sola adición de IPTG, en donde preferentemente se continua dicha alimentación del cultivo con la fuente de carbono principal. Dado que IPTG no es metabolizado por el huésped bacteriano, la inducción puede lograrse mediante la adición de IPTG en la concentración deseada. De manera alternativa, la inducción puede lograrse mediante un flujo continuo de IPTG al cultivo. En una realización preferente, la inducción se realiza mediante una sola adición de IPTG o un flujo continuo, en donde se continua dicha alimentación del cultivo discontinuo con la fuente de carbono principal con una tasa de flujo constante o una tasa de flujo creciente de dicha fuente de carbono principal, tasa de flujo exponencialmente creciente de dicha fuente de carbono principal.

35 Inducción con lactosa: Como se describe con anterioridad, la inducción de expresión de proteína puede lograrse de manera alternativa mediante la adición de lactosa al medio de cultivo. En una realización de la invención, al comienzo de la fase de producción la alimentación exponencial del sustrato se ve interrumpida y se suministra al cultivo un flujo constante de medio de inducción que contiene de 100 a 300g/l, preferentemente 100g/l de lactosa como la única fuente de carbono (medio de alimentación de lactosa). Preferentemente, la tasa de flujo constante de lactosa iguala aproximadamente la tasa de flujo del sustrato al final de la fase de alimentación.

40 En una realización preferente de la invención dicha inducción de dicho promotor con un inductor se logra mediante la adición de lactosa, en donde preferentemente dicha lactosa se alimenta a dicho cultivo discontinuo en un flujo continuo durante y en donde preferentemente no se continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

45 Ante la adición de lactosa al cultivo, aumenta la actividad de β-galactosidasa, la lactosa se convierte en alolactosa lo cual induce al promotor tac y se inicia la expresión de la cápside recombinante. Paralelamente, la alolactosa se metaboliza y contribuye al suministro de energía para el huésped bacteriano. El equilibrio de la tasa de alimentación del medio de inducción y el consumo de lactosa por las células determina de este modo la tasa de expresión. Las reacciones enzimáticas involucradas en esta cascada permiten controlar el proceso de modo tal que se minimiza la formación de cuerpos de inclusión. El progreso del proceso de inducción puede controlarse mediante la determinación de la actividad de β-galactosidasa en el cultivo, por ejemplo, mediante un Kit de ensayo β-Gal (Invitrogen, K1455-01).

50 En una realización más preferente de la invención dicha inducción de dicho promotor con un inductor se logra mediante la adición de lactosa, en donde preferentemente dicha lactosa se alimenta a dicho cultivo discontinuo en un flujo continuo durante y en donde preferentemente se continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

Adición discontinua del inductor: Dicho inductor puede agregarse al cultivo de manera discontinua mediante una sola adición al comienzo de la fase de producción o mediante varias adiciones subsiguientes durante la fase de producción. La adición discontinua de un inductor, en especial mediante una sola adición es particularmente apropiada cuando el inductor es IPTG, dado que IPTG no es metabolizado por el huésped bacteriano. Por lo tanto, de manera habitual y preferente, no es necesario ningún reemplazo de IPTG metabolizado durante la fase de producción. En una realización dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la adición de dicho inductor, preferentemente IPTG o lactosa, más preferentemente IPTG a dicho medio, en donde dicho inductor se agrega en aproximadamente su concentración final de una vez en una sola adición al comienzo de la fase de producción, en donde preferentemente continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal. En una realización preferente, dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la adición de IPTG a dicho medio, en donde se agrega IPTG en aproximadamente su concentración final de una vez en una sola adición, en donde preferentemente continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal. De manera alternativa, dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la adición de dicho inductor, preferentemente IPTG o lactosa, más preferentemente lactosa a dicho medio, en donde dicha adición se realiza en varios pasos, preferentemente en de 1 a 5, más preferentemente de 2 a 4, más preferentemente en 3 pasos durante la fase de producción, en donde preferentemente continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

Adición continua (alimentación) del inductor: Preferentemente, dicho inductor se agrega al medio en un flujo continuo, preferentemente durante toda la fase de producción. La adición continua del inductor es particularmente apropiada para la lactosa, dado que la lactosa es metabolizada por el huésped bacteriano y por lo tanto una adición continua de lactosa durante la fase de producción permite mantener una concentración de lactosa en el medio que permite la inducción eficiente del promotor. En una realización preferente, dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor, en donde dicho inductor es preferentemente IPTG o lactosa, más preferentemente lactosa, y en donde dicha alimentación se realiza en un flujo continuo, en donde más preferentemente dicha alimentación se realiza durante toda la fase de producción.

Co-alimentación del inductor y la fuente de carbono principal: La expresión de la proteína recombinante es un proceso que requiere energía. Para evitar la pérdida de rendimiento que puede causarse por el consumo excesivo del inductor por el huésped bacteriano y bajas tasas de expresión que se producen por ello, el cultivo puede ser complementado de manera adicional con sustrato, preferentemente la fuente de carbono principal, durante la fase de producción, en donde la tasa de flujo del inductor y/o la fuente de carbono principal es constante o creciente, preferentemente constante. Cuando durante la fase constante el cultivo es complementado con sustrato a una tasa de flujo creciente, la tasa de flujo creciente es preferentemente creciente con una tasa exponencial.

Co-alimentación a una tasa de flujo constante: En una realización preferente, dicho inductor de dicho promotor con un inductor se hace mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor y dicha fuente de carbono principal, en donde dicho inductor es preferentemente IPTG o lactosa, más preferentemente lactosa, y en donde dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol, preferentemente glicerol, en donde dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol son co-alimentadas a dicho cultivo a una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo es de manera preferente aproximadamente constante. En otra realización preferente, dicha tasa de flujo se selecciona para permitir la alimentación de dicha fuente de carbono principal a dicho cultivo discontinuo a aproximadamente la misma tasa al final de la fase de crecimiento. En otra realización preferente dicho inductor, preferentemente lactosa, y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, están contenidos en el mismo medio (medio de co-alimentación). En otra realización preferente dicho medio de co-alimentación se alimenta a dicho cultivo discontinuo con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo preferentemente es constante, y en donde más preferentemente dicha tasa de flujo se selecciona para permitir la alimentación de dicha fuente de carbono principal a dicho cultivo discontinuo a aproximadamente la misma tasa al final de la fase de crecimiento. En una realización muy preferente, dicho inductor es lactosa y dicha fuente de carbono principal es glicerol, en donde dicha lactosa y dicho glicerol son co-alimentados a dicho cultivo discontinuo en una proporción de aproximadamente 2:1 a 1:4 (w/w).

En otra realización preferente de la invención la lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, son co-alimentados a dicho cultivo discontinuo en una proporción de 0:1 a 1:0 (w/w), de manera preferente aproximadamente de 2:1 a aproximadamente 1:4 (w/w), de manera más preferente aproximadamente de 1:1 a 1:3 (w/w), de manera aún más preferente la proporción es de aproximadamente 1:3 (w/w). En una realización preferente, la proporción de lactosa y la fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, es 1:1 (w/w). En otra realización preferente, la proporción de lactosa y la fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, es 1:3 (w/w). En una realización más preferente, dicho medio de co-alimentación comprende aproximadamente 200g/l de lactosa y aproximadamente 200g/l de glicerol. En una realización aún más preferente, el medio de co-alimentación comprende aproximadamente 100g/l de lactosa y aproximadamente 300g/l de glicerol.

Co-alimentación a una tasa de flujo creciente: De manera alternativa, dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor y dicha fuente de carbono principal, en donde dicho inductor es preferentemente IPTG o lactosa, más preferentemente lactosa, y en

donde dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol, preferentemente glicerol, en donde dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol son co-alimentados a dicho cultivo discontinuo a una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo es creciente, en donde dicha tasa de flujo aumenta con una característica lineal o exponencial, en donde preferentemente la tasa de flujo inicial se selecciona para permitir la alimentación de dicha fuente de carbono principal a dicho cultivo discontinuo a aproximadamente la misma tasa al final de la fase de crecimiento.

De manera alternativa, dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor y dicha fuente de carbono principal, en donde dicho inductor es preferentemente IPTG o lactosa, más preferentemente lactosa, y en donde dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol, preferentemente glicerol, en donde dicho inductor, preferentemente lactosa se alimenta a dicho cultivo discontinuo a una primera tasa de flujo, y en donde dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol es co-alimentada a dicho cultivo discontinuo a una segunda tasa de flujo, en donde dicha primera tasa de flujo es constante o creciente, preferentemente constante, y en donde dicha segunda tasa de flujo es constante o creciente, preferentemente creciente, en donde preferentemente el valor inicial de dicha segunda tasa de flujo se selecciona para permitir la alimentación de dicha fuente de carbono principal a dicho cultivo discontinuo a aproximadamente la misma tasa al final de la fase de crecimiento. En una realización muy preferente, dicho inductor es lactosa y dicha fuente de carbono principal es glicerol, en donde dicha lactosa y dicho glicerol son co-alimentados a dicho cultivo discontinuo en una proporción de aproximadamente 2:1 a 1:4 (w/w).

El crecimiento del huésped bacteriano como se determina por CDW, CWW o OD<sub>600</sub> continúa durante la fase de producción a una tasa de crecimiento que es inferior que la que se produce durante la fase de crecimiento y que disminuye con el tiempo de proceso. En otra realización de la invención, dicha inducción de dicho promotor se realiza mediante la co-alimentación de dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, a dicho cultivo discontinuo con una tasa de flujo creciente, preferentemente con una tasa de flujo en donde el aumento gradual de la tasa de flujo se adapta a la tasa de crecimiento real del cultivo. En otra realización preferente dicho inductor, preferentemente lactosa, y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, están contenidos en el mismo medio (medio de co-alimentación), en donde preferentemente la proporción entre lactosa y glicerol en dicho medio (medio de co-alimentación) oscila entre aproximadamente 0:1 y 1:0 (w/w), de manera preferente aproximadamente de 2:1 a aproximadamente 1:4 (w/w), de manera más preferente aproximadamente de 1:1 a 1:3 (w/w), de manera aún más preferente la proporción es de aproximadamente 1:3 (w/w). En una realización preferente, la proporción de lactosa y la fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, es 1:1 (w/w). En otra realización preferente, la proporción de lactosa y la fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, es 1:3 (w/w). En una realización más preferente, dicho medio (medio de co-alimentación) comprende aproximadamente 200g/l de lactosa y aproximadamente 200g/l de glicerol. En una realización aún más preferente, el medio de inducción comprende aproximadamente 100g/l de lactosa y aproximadamente 300g/l de glicerol.

En una realización de la invención, dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza mediante la co-alimentación de dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, a dicho cultivo discontinuo, en donde dicho inductor, preferentemente lactosa y dicha fuente de carbono principal, preferentemente glicerol, están contenidos en medios separados que se alimentan de manera separada a dicho cultivo.

Al final de la fase de producción las células se cosechan por centrifugación. Habitualmente, las células son cosechadas aproximadamente 5 horas después del comienzo de la inducción, cuando se alcanza un OD<sub>600</sub> final de 90 a 130. Una extensión mayor de la fase de producción lleva a un OD<sub>600</sub> y valores CWW mayores y por lo tanto a un rendimiento mejorado del constructo de expresión.

Las células cosechadas pueden suspenderse en un tampón de almacenamiento y almacenarse a -80 °C para un procesamiento adicional.

El contenido de proteína total de las células se determina después de la lisis celular mediante SDS PAGE o LDS PAGE y la comparación con una proteína estándar. El contenido de proteína soluble se determina mediante HPLC. La identidad de la proteína de la cápsida expresada se determina mediante western blotting. La concentración de las VLPs ensambladas puede analizarse mediante cromatografía de exclusión por tamaños (Ejemplo 18). VLP pueden purificarse de manera preparativa a partir de las células lisadas por métodos de cromatografía.

Un aumento de la escala del proceso de la invención a grandes volúmenes es posible con sólo pequeñas adaptaciones. La invención comprende volúmenes de cultivo en el rango de 100ml a hasta 6000 l. Los volúmenes de cultivo preferente son 40 a 100 l, más preferentemente alrededor de 50 l. Es aparente para los expertos que mayores volúmenes de cultivo en particular requieren mayores volúmenes de precultivo que se utiliza para inoculación. Por ejemplo, un precultivo puede realizarse en dos o más pasos con un volumen creciente de precultivo. Para asegurar la retención de plásmido en grandes volúmenes de cultivo, los precultivos que se utilizan como inóculo pueden contener un antibiótico para mantener la presión de selección. Un experto sabe que la retención de

plásmido puede mejorarse más reduciendo la cantidad de generaciones que son necesarias para alcanzar la densidad celular final deseada. Por lo tanto, es ventajoso inocular los precultivos y los cultivos discontinuos con altas densidades celulares. En una realización preferente el  $OD_{600}$  inicial del precultivo es de 0,1 a 0,4, preferentemente de alrededor de 0,3.

5 En una realización, antes de dicho paso de cultivo dicho proceso también comprende el paso de introducir dicho huésped bacteriano en un medio, en donde dicha introducción se realiza con un inóculo, en donde dicho inóculo se produce en un proceso de precultivo que comprende el paso de crecer dicho huésped bacteriano en un medio que comprende un antibiótico, preferentemente kanamicina. Más preferentemente, dicho proceso de precultivo comprende los pasos de crecer dicho huésped bacteriano en un primer medio que comprende un antibiótico,  
10 preferentemente kanamicina, y diluir dicho primer medio que comprende el huésped bacteriano con un segundo medio a un  $OD_{600}$  de 0,1 a 0,4, preferentemente alrededor de 0,3, en donde dicho segundo medio está esencialmente libre de antibióticos, y cultivar dicho huésped bacteriano.

Además, es evidente para los expertos, que el proceso de fermentación de la invención es un proceso aeróbico que requiere un suministro de oxígeno adecuado de las bacterias en el cultivo. La demanda de oxígeno del huésped bacteriano es incrementada, entre otras cosas, con la densidad celular creciente y la tasa de crecimiento creciente.  
15 Según el volumen total y la demanda de oxígeno del huésped bacteriano, el oxígeno puede, por ejemplo, suministrarse mediante agitación y/o aireación con aire. De manera alternativa, el oxígeno puede suministrarse con aireación de oxígeno puro o una mezcla de oxígeno puro con cualquier otro gas, preferentemente aire, en donde el oxígeno puro hace referencia al gas técnicamente puro que habitualmente está disponible para fines técnicos. Otra  
20 posibilidad de suministrar oxígeno al huésped bacteriano es aumentar la presión parcial del oxígeno en el medio incrementando la presión en el fermentador.

En una realización preferente de la invención, dicho cultivo de dicho huésped bacteriano y/o dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo y/o dicha inducción de dicho promotor con un inductor se realiza bajo condiciones, en donde dicho huésped bacteriano se suministra con oxígeno, preferentemente mediante aireación con aire, más preferentemente mediante aireación con aire en un flujo constante, en donde preferentemente dicho oxígeno se suministra en todo el proceso, más preferentemente en toda la fase de latencia, crecimiento y producción, y en donde más preferentemente la presión parcial del oxígeno se controla en el medio de cultivo y en donde el huésped bacteriano se suministra de manera alternativa o adicional con oxígeno mediante aireación con oxígeno puro, preferentemente cuando la presión parcial del oxígeno en el medio ( $pO_2$ ) se encuentra debajo de un umbral determinado. En una realización específicamente preferente dicho umbral de  $pO_2$  se encuentra en el rango de 0% a 60%, preferentemente de 10% a 50%, más preferentemente de 20% a 45%, más preferentemente dicho umbral es de aproximadamente 40%.

El suministro de oxígeno, preferentemente mediante aireación con aire y/o oxígeno puro para mantener el  $pO_2$  preferente como se describe con anterioridad, se aplica a modo de rutina en el proceso de la invención, preferentemente para volúmenes de cultivo de 21 o más. La aireación con oxígeno de la manera descrita es especialmente preferente en el proceso de aumento de escala, más preferentemente de 40 a 1001 y más.

Por lo tanto, una realización de la invención es un proceso de expresión de una proteína de la cápside recombinante de un bacteriófago, o un mutante o fragmento de la misma capaz de formar un VLP mediante auto-ensamblaje, en donde dicho bacteriófago es un bacteriófago de ARN, y en donde dicho proceso comprende los pasos de a)  
40 introducir un plásmido de expresión en un huésped bacteriano, en donde dicho plásmido de expresión comprende un constructo de expresión, en donde dicho constructo de expresión comprende (i) una primera secuencia de nucleótido que codifica dicha proteína de la cápside recombinante, o mutante o fragmento de la misma, y (ii) un promotor que es inducible por lactosa; b) cultivar dicho huésped bacteriano en un medio que comprende una fuente de carbono principal; en donde dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol, y en donde dicho cultivo se realiza en cultivo discontinuo y en condiciones bajo las cuales dicho promotor se reprime por  $laci$ , en donde dicho  $laci$  es sobreexpresado por dicho huésped bacteriano; c) alimentar dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal; y d) inducir dicho promotor con un inductor, en donde se continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal; en donde en los pasos de b.) a d.) de dicho proceso, el oxígeno se suministra a dicho huésped bacteriano por un  $pO_2$  en dicho medio de al menos aproximadamente de 10% a 50%, preferentemente de alrededor de 40%, y en donde más preferentemente dicho oxígeno se suministra mediante aireación con aire, oxígeno puro, o una mezcla de ambos, preferentemente mediante una mezcla de aire y oxígeno puro.



de 0,3. Los matraces oscilantes fueron incubados durante 4 horas (OD<sub>600</sub> entre 4 y 5) a 30°C y una agitación de 220rpm. La inducción se realizó con 0,5% de lactosa durante 4 horas. La producción de proteína fue determinada mediante SDS-PAGE. El gel mostró una banda de proteína potente que fue identificada como Qβ CP.

**Ejemplo 4**

5 **Expresión de AP205 CP bajo el control del promotor tac y SD versus nSD**

Se analizaron 9 clones de pTac-nSDAP205 (SEQ ID NO:30) y 6 clones de pTac-SDAP205 en matraces oscilantes. pTac-SDAP205 (SEQ ID NO:40) es idéntico a pTac-nSDAP205 pero comprende la secuencia de Shine-Dalgarno de SEQ

10 ID NO:4 en lugar de la de SEQ ID NO:3. Cada matraz contenía 50ml del medio R40 (medio de cultivo principal, Hypep 7455, glicerol, véase el Ejemplo 5) con kanamicina (25Pg/ml) y se inoculó con cultivos durante la noche a un OD<sub>600</sub> inicial de 0,3 (para pTac-nSDAP205) o 0,4 (pTac-SDAP205). Los matraces oscilantes fueron incubados durante 4 horas a 30°C y una agitación de 220rpm. La inducción se realizó con 0,5% de lactosa. La producción de proteína fue determinada mediante SDS-PAGE. Para todos los clones evaluados la expresión de AP205 CP fue significativamente más potente de pTac-nSDAP205 que de pTac-SDAP205.

15 **Ejemplo 5**

**Composición del medio de cultivo**

Los medios de cultivo fueron compuestos como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo.

Componente	Concentraciones en [g/L]				
	Medio principal + Hypep	Medio principal + Hypep + Glicerol	Medio de alimentación + 50% de glicerol	Inducción Medio +20% Glicerol +20% Lactosa	Medio principal + Bacto YE + Glicerol
	R27	R40	R41	R42	R43
Na2HPO4 2H2O	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
KH2PO4	3	3	3	3	3
K2HPO4	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
Citrato (NH4)2SO4	3,86	3,86	3,86	3,86	3,86
Vit B1	4	4	4	4	4
CaCl2 2H2O	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MgSO4 7H2O	0,0147	0,0147	0,0147	0,0147	0,0147
FeCl3 6H2O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
CoCl2 6H2O	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054
MnCl2 4H2O	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
CuCl2 2H2O	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
H3BO3	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
Na2MoO4 2H2O	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Zn(CH3COO)2 2H2O	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
Glucosa	0,0026	0,0026	0,0026	0,0026	0,0026
Glicerol	5	-	-	-	-
Lactosa anhidra	-	5	500	200	5
HyPep 7455	-	-	-	200	-
Extracto de levadura bacto	5	-	-	-	-

20 **Ejemplo 6**

**Expresión de Qβ CP en un proceso discontinuo alimentado (Escala de 2L)**

El proceso de fermentación se realizó en un bioreactor (fondo cóncavo Applikon de 5L) equipado con 2 agitadores de disco (Ø 6cm), deflectores (3 x 16cm), pH-, pO<sub>2</sub>-, y control de temperatura y software para fermentación BioXpert Versión 2.22.

Se inocularon 5µL de criocultivo de RB791 transformado con plásmidos pTac-nSD-Qb-mut en matraces de 100mL Erlenmeyer que contenían 50mL del medio R40 (25Pg/mL kanamicina) y se cultivaron por 14 horas a 30°C y 220 RPM durante la noche. Después de 14 horas se alcanzó el valor de OD<sub>600</sub> de 6,0. Para la fermentación discontinua, se bombearon 2L del medio (R40) en el bioreactor. En la Tabla 2 se enumeran los parámetros de cultivo.

5

**Tabla 2: Valores determinados de los parámetros para la fase discontinua.**

Parámetro	Valor determinado	Unidad
Velocidad del agitador	1000	[rpm]
Suministro de aire	2,5	[L/min]
Suministro de O <sub>2</sub> , máximo	2	[L/min]
Temperatura	30	[°C]
Saturación de O <sub>2</sub>	> 40	[%]
pH	6,8	[-]

El bioreactor se inoculó con 100mL de inóculo. Se tomaron muestras de 2mL, se determinó OD<sub>600</sub> y se centrifugaron a 14'000 RPM. Se separaron los sedimentos y sobrenadantes y se congelaron para su futuro análisis. La concentración de biomasa [g/L] se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$OD_{600} \times 0.45 [g \times L^{-1} \times OD_{600}^{-1}] = \text{biomasa} [g/L].$$

- 10 El contenido Q<sub>β</sub> en porcentaje del contenido total de proteína se calculó de la siguiente manera, asumiendo que 50 % de la biomasa de E. coli es proteína:

$$\text{Biomasa} [g \times L^{-1}] / 2 = \text{proteína total} [g \times L^{-1}]$$

$$Q_{\beta} [g \times L^{-1}] / \text{proteína total} [g \times L^{-1}] \times 100 = Q_{\beta} / \text{proteína total} [\%].$$

- 15 En el modo discontinuo alimentado, que prosiguió al modo discontinuo, se agregó una fase de alimentación. En la fase de alimentación se suministra un sustrato a las células en el reactor según un perfil definido. El perfil de alimentación depende de la tasa de crecimiento seleccionada  $\mu$ , el coeficiente de rendimiento de biomasa a glicerol ( $Y_{x/glicerol}$ ), el volumen (V<sub>f</sub>), y la concentración del sustrato de alimentación (c<sub>f</sub>). La alimentación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{mf} = (\mu / Y_{x/s} + m) \quad V_f \times X_f \times e^{\mu t}$$

$$\text{pump} = (\text{mf} / c_f + b) / a$$

mf	=	flujo de masa [g/h]
$\mu$	=	flujo de masa [g/h]
$Y_{x/glicerol}$	=	rendimiento de biomasa a glicerol [g/g]
m	=	energía de mantenimiento [ $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ]
X <sub>f</sub>	=	Volumen al comienzo de la alimentación
X <sub>f</sub>	=	Biomasa al comienzo de la alimentación
c <sub>f</sub>	=	Concentración del sustrato en la alimentación [g/mL]
a+b	=	compensación / descenso de la ecuación de calibración de la bomba

- 20 Para determinar los parámetros de calibración a y b, se realizó una calibración de la bomba. Además, el tubo de alimentación con frasco de alimentación se sujetó a la bomba de alimentación y la bomba se puso en funcionamiento con un 7, 14 y 21% de rendimiento de la bomba. Se registró el volumen de alimentación bombeado por tiempo. En un diagrama resultante de la rotación del funcionamiento de la bomba [%] a la solución de alimentación bombeada [mL/h], se determinaron la pendiente (a) y la sección del eje Y (b). En el bioreactor, se fijaron los parámetros en la Tabla 3 para el cultivo discontinuo alimentado.
- 25

**Tabla 3: Parámetros para el cultivo discontinuo alimentado en el bioreactor.**

Parámetro	Valor determinado	Unidad
Velocidad del agitador	1000	[rpm]
Suministro de aire	2,5	[L/min]
Suministro de O <sub>2</sub> , máximo	2	[L/min]
Temperatura	30	[°C]
Saturación de O <sub>2</sub>	> 40	[%]
pH	6,8	[-]

5 Después de alcanzar un tiempo del proceso de aproximadamente 7 horas (final de fase discontinua) la bomba de alimentación se encendió automáticamente. Después de otras 7 horas de cultivo, cuando el OD<sub>600</sub> llegó a 55-60, el medio de alimentación (para la propagación de biomasa) se intercambiò con el medio de inducción R42 (para la propagación de biomasa e inducción). Después de 5 horas se detuvo la alimentación de R42 y se cosechó el cultivo mediante centrifugación.

Análisis de los parámetros del proceso:

10 Se analizaron de manera rutinaria los siguientes parámetros del proceso. El pO<sub>2</sub>, pH, temperatura y velocidad del agitador se midieron en línea durante todo el proceso. La densidad óptica se midió fuera de línea en 600nm. La determinación de la actividad β-galactosidasa se realizó utilizando un kit de ensayo β-Gal (Invitrogen, cat. N° K1455-01). La actividad se especificó como unidades por mL OD<sub>600</sub> = 1,0. Se define como la cantidad de Orto-Nitrofenil β-D-Galactopiranosido (ONPG) en nmol, que es hidrolizado por minuto y mL de suspensión bacteriana (OD<sub>600</sub> = 1.0).

15 El producto acumulado se analizó mediante SDS-PAGE, el contenido total de proteína (proteína soluble e insoluble) se determinó y utilizando análisis de HPLC, se midió la fracción soluble. La interrupción celular de E.coli se realizó en tampón de lisis (50mM de glucosa, 25mM tris/HCl (pH 8), 15mM EDTA (pH 8,0)) con un homogenizador ultrasónico (Bandlin Sonoplus, HD2070). 250μL de suspensión bacteriana con un OD<sub>600</sub> de 50 se centrifugaron con 14000RPM durante 10 minutos. El sedimento se re-suspendió en 250μL de tampón de lisis (vórtex) y se colocó a

20 temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de ello, las células fueron interrumpidas por 20s con ultrasonido al 10 % del funcionamiento del dispositivo (células en hielo) y después la suspensión celular se centrifugó a 14000RPM, 10 minutos. El sobrenadante (proteína soluble) se analizó mediante SDS-PAGE y HPLC.

Se tomaron muestras antes de la inducción y al final de la producción (después de 5 horas de inducción) del bioreactor para el análisis de formación de Qβ analizada por SDS-PAGE estandarizada a OD 5.0. Al final del cultivo,

25 se cosechó 1,9 l del cultivo. Después de la centrifugación, se obtuvieron los siguientes sedimentos celulares en tres ejecuciones independientes del reactor: 1.) OD<sub>600</sub> final de 84: 194 g CWW; 2.) OD<sub>600</sub> final de 88: 200 g CWW; 3.) OD<sub>600</sub> final de 86: 201 g CWW. La retención de plásmido en la ejecución 1 y 2 fue del 100 % al comienzo de la inducción y 100 % en el momento de la cosecha. En base a la comparación con un estándar Qβ CP en SDS-PAGE el rendimiento se estimó aproximadamente en 56/100. El análisis HPLC reveló una concentración de

30 aproximadamente 6g/l Qβ VLP.

### Ejemplo 7

#### Selección de la fuente de carbono y cepa bacteriana

Se compararon la glucosa y glicerol como fuentes de carbono. Para evaluar el comportamiento de crecimiento de cada una de las cepas DH20 y RB791 en estas fuentes de carbono, se realizaron experimentos con matraces

35 oscilantes con un medio que contenía glucosa (R27) y un medio que contenía glicerol (R40). Ambos medios fueron complementados con 25μg/ml de kanamicina. Cada cultivo se inició con un OD<sub>600</sub> inicial de 0,3. La inducción se realizó agregando 0,5% de lactosa. Se determinaron las tasas de crecimiento específicas máximas ( $\mu_{max}$ ) y sus coeficientes de rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) y se enumeran en la Tabla 4. RB791 creció más rápido en ambos, glucosa y glicerol. Además, los coeficientes de rendimiento resultantes fueron más altos. Aunque la glucosa permitió que haya

40 tasas de crecimiento específicas máximas ( $\mu_{max}$ ) los coeficientes de rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) fueron superiores para el glicerol.

Tabla 4: Las tasas de crecimiento específicas máximas y los coeficientes de rendimiento de los experimentos de cultivo con RB791 y DH20 en glucosa y glicerol.

Cepa	Fuente de carbono	Valor después de 4,5 horas de tiempo de cultivo		Tasa de crec. espec. máx. ( $\mu_{\max}$ ) [ $\text{h}^{-1}$ ]	Coeficiente de rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) de biomasa del sustrato [g/g]
		OD <sub>600</sub>	Acetato [g l <sup>-1</sup> ]		
RB791	glucosa	6,24	0,44	0,71	0,72
	glicerol	4,04	0,21	0,62	0,86
DH20	glucosa	2,52	0,42	0,51	0,71
	glicerol	2,82	0,25	0,50	0,81

### Ejemplo 8

#### 5 Determinación de la temperatura óptima

Se investigó la influencia de la temperatura en la formación del producto. Se inocularon dos cultivos en matraces oscilantes y se incubaron a 30°C y 220 rpm. Después de alcanzar un OD<sub>600</sub> de 5, los cultivos fueron inducidos con lactosa. Posteriormente, un cultivo se incubó a 37°C y el otro cultivo a 23°C. Los resultados del SDS-PAGE revelaron que los niveles de expresión 4 y 5 horas después de la inducción son mayores que en el cultivo inducido a 37°C. La inducción de los cultivos durante 19 horas mostró un nivel de Q $\beta$  más alto en los cultivos inducidos a 23°C.

### Ejemplo 9

#### Inducción mediante co-alimentación de lactosa y glicerol

Se compuso una solución de alimentación de 20 % glicerol y 20% lactosa (R42) y se aplicó a la fermentación como se describe en el Ejemplo 6 en el comienzo de la inducción. La figura 1 proporciona un panorama general de los parámetros relevantes del proceso en todo el proceso. La expresión fue inducida a las 13,5 horas a un OD<sub>600</sub> de aproximadamente 55. Ante la inducción, la tasa de bomba de alimentación se fijó en constante. El glicerol no se acumuló con la alimentación. La lactosa se acumuló a 4g/l y después comenzó a disminuir. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa aumentó a 10U/ml y después bajó. En comparación con las ejecuciones de fermentación previa a.) lactosa aplicada como un solo pulso de lactosa en el comienzo de la inducción, sin alimentación; b) alimentación continua de lactosa sin glicerol, la actividad fue 7U/ml más alta y la actividad máxima ya se había alcanzado después de 2 horas en comparación con 4 horas en las ejecuciones a.) y b.).

### Ejemplo 10

#### Retención de plásmido

El efecto de las siguientes condiciones operativas sobre la retención de plásmido se evaluó en el proceso que se describe en el Ejemplo 6: 1.) Volumen inicial de precultivo, 2.) Kanamicina en el precultivo, 3.) Crecimiento y/o inducción a 37°C vs. 30°C. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Los precultivos se comenzaron con volúmenes de 5  $\mu$ l del vial del banco celular. La inoculación de un pequeño volumen permitió el crecimiento de un precultivo durante la noche. El precultivo para QT0103\_F8 contenía 25mg/l de kanamicina, mientras que el precultivo para QT0103\_F7 no contenía kanamicina. Ambas fermentaciones se operaron a 30°C y se indujeron durante 5 horas. A juzgar por las retenciones de plásmido antes y después de 5 horas de inducción, complementar el precultivo con kanamicina tuvo un efecto positivo sobre la retención de plásmido. La retención de plásmido siguió al 98% antes y después de 5 horas de inducción. En cambio, las retenciones de plásmidos sólo alcanzaron valores del 80% cuando la kanamicina se omitió del precultivo. Para una ejecución posterior, QT0203\_F7, el precultivo también se comenzó con 5  $\mu$ l y se hizo crecer en un medio que contenía kanamicina. La fermentación resultante en el bioreactor se operó a 37°C desde el comienzo. La operación a 37 °C tuvo un efecto negativo sobre la estabilidad del plásmido. Mientras que la retención de plásmido se encontraba al 99% antes de la inducción, se redujo al 0% después de 5 horas de inducción. Para evaluar si un precultivo más corto y, por lo tanto, menos generaciones, mejoraría la retención de plásmido después de 5 horas de inducción, se inició una serie de precultivos con 300  $\mu$ l de volumen de un vial del banco celular descongelado y se crecieron en un medio sin kanamicina. Se operaron dos fermentadores a 30°C para toda la ejecución. Dos fermentadores adicionales se operaron primero a 30°C para el crecimiento celular y después se cambiaron a 37°C para la fase de producción. Las estabildades de plásmido resultantes fueron todas del 100% antes y 5 horas después de la inducción.

Tabla 5: El resumen de la retención de plásmido antes y 5 horas después de la inducción obtenido bajo diferentes condiciones operativas en términos de generaciones en el precultivo, con o sin kanamicina en el precultivo, y crecimiento y/o inducción a 37°C.

Ejecución del bioreactor	Volumen de cultivo inicial de precultivo [μl]	Kanamicina en precultivo	Retención de plásmido antes de la induc. [%]	Retención de plásmido 5 h después de la induc. [%]	Notas
QT0103_F8	5	25mg/L	98	98	todo el proceso a 30°C
QT0103_F7	5	no	80	80	todo el proceso a 30°C
QT0203_F7	5	25mg/L	99	0	Bioreactor operó a 37°C
QT0603_F7	300	no	100	100	todo el proceso a 30°C
QT0703_F8	300	no	100	100	Inducción a 37°C, el resto del proceso a 30°C
QT0803_F9	300	no	100	100	todo el proceso a 30°C
QT0903_F10	300	no	100	100	Inducción a 37°C, el resto del proceso a 30°C

## 5 Ejemplo 11

### Variación en el momento de inducción

En un proceso esencialmente como se describe en el Ejemplo 6, el perfil de alimentación exponencial se programó para comenzar 7 horas después de la inoculación del bioreactor. Bajo condiciones estándares, el tiempo programado para la inducción fue a las 14 horas del proceso. Para evaluar el efecto de las variaciones en el momento de inducción en las densidades celulares finales, se indujo un cultivo a las 13,5 horas (lo cual resulta en 6,5 horas de alimentación exponencial) y otro cultivo a 14,5 horas (lo cual resulta en 7,5 horas de alimentación exponencial). Un cultivo inducido a las 14 horas del proceso sirvió como control (7 horas de alimentación exponencial). Los resultados se resumen en la Tabla 6. La densidad celular aumentó con el largo creciente de la alimentación. A juzgar por un análisis de regresión lineal de los datos disponibles para CWW final, parece existir una relación lineal ( $r^2 = 0,92$ ).

Tabla 6: Variaciones en el momento de inducción: efecto de la densidad celular final en términos de OD<sub>600</sub> y CWW.

Reactor	Momento de inducción en el proceso	Duración del exp. Fase de alimentación [h]	OD <sub>600</sub> final	CWW final [g/L]
F2	13h32min	6,5	83,4	116,5
F1	14h02min	7,0	82,4	122,5
F3	14h29min	7,5	100,4	141,1

## Ejemplo 12

### 20 Variación en el momento de cosecha

La cosecha del cultivo en un proceso esencialmente como se describe en el Ejemplo 6 se realiza de manera manual. Bajo condiciones estándares, el tiempo programado para la cosecha fue a las 19 horas del proceso. La operación "Cosecha" implica el final manual de las operaciones del bioreactor. Para evaluar el efecto de las variaciones en el momento de cosecha en las densidades celulares finales, se indujo un cultivo a las 18,8 horas (lo cual resulta en 4,8 horas de inducción) y otro cultivo a 19,5 horas (lo cual resulta en 5,5 horas de inducción). Un cultivo cosechado a las 19 horas del proceso sirvió como control (5 horas de inducción). Los resultados se resumen en la Tabla 7. La densidad celular aumentó con un largo creciente de la inducción debido a que las células siguen creciendo mientras se inducen.

30 Tabla 7: Variaciones en el momento de cosecha: efecto de la densidad celular final en términos de OD<sub>600</sub> y CWW.

Reactor	Momento de cosecha en el proceso	Largo de la inducción [h]	OD <sub>600</sub> final	CWW final [g/L]
F5	18h50min	4,8	91,4	122,4
F4	19h00min	5,0	92,2	127,5
F6	19h30min	5,5	96,0	132,4

**Ejemplo 13**

**Efecto de la temperatura**

El efecto de la temperatura de fermentación en un proceso esencialmente como se describe en el Ejemplo 6 se investigó ejecutando 6 fermentaciones en 5 temperaturas diferentes. Los resultados se resumen en la Tabla 8. Las densidades celulares finales son sensibles a la temperatura de fermentación con un nivel óptimo a una temperatura de 30°C.

Tabla 8: Resultados resumidos de temperaturas diferentes en la densidad celular final en términos de OD<sub>600</sub> y CWW.

Reactor	Temperatura [°C]	OD <sub>600</sub> final	CWW final [g/L]
F5	25,0	37,8	62
F4	27,5	80,0	117
F3	30,0	92,8	123
F4	30,0	92,4	125
F5	32,5	85,0	111
F6	35,0	79,6	107

10 **Ejemplo 14**

**Fermentación a mayor escala (50 l)**

El proceso descrito en el Ejemplo 6 se realizó a mayor escala a un volumen de 50 l para evaluar la capacidad a mayor escala del sistema de bioreactor en funcionamiento de volumen de 2 L a un volumen mayor. Los parámetros claves del proceso para el proceso a mayor escala se resumen en la Tabla 9.

15 Tabla 9: Parámetros del proceso en bioreactor de 50L.

Paso de cultivo	Descripción	Tiempo [h]	OD <sub>600</sub>
Precultivo 1	300µl del vial de banco celular se transfieren a un medio de precultivo de 100ml contenido en matraces oscilantes de 500mL y cultivan durante 16 horas	-11*	5,0
Precultivo 2	Calcular el volumen requerido para la transferencia para comenzar con OD <sub>600</sub> inicial de 0,3 en 750ml. Transferencia del volumen calculado (por ejemplo, 50ml) en 750ml de medio de precultivo contenido en matraces oscilantes de 5000mL	-5*	4,0
Inoculación de bioreactor	Volumen calculado combinado (por ejemplo 1,4L) se transfiere al bioreactor de 50L. Volumen inicial: =40L	0	
Comienzo de la inducción	El perfil de alimentación exponencial se cambia a constante y la alimentación se cambia a alimentación de inducción	14	46
Final del cultivo	El cultivo se completa después de 5 horas de inducción	19	128

\* En relación al tiempo de inoculación del bioreactor.

Fue necesario tener dos pasos de expansión de precultivo. En el primer paso, las células se expresan como se establece para el proceso de 2L (Ejemplo 6). Después de este paso, las células se dividieron en dos cultivos en matraces oscilantes de 5000ml, que contenían cada una un medio de 750ml. Se realizó más expansión por 5 horas. Los cultivos en los bioreactores de 50L se realizaron con el mismo perfil que en el sistema de 2 L (Ejemplo 6). OD<sub>600</sub> en el comienzo de la inducción fue 46, el OD<sub>600</sub> final fue 128. La retención de plásmido fue 100 % antes de la inducción y 98 % al final del cultivo. La concentración de la proteína QB CP en el medio al final del cultivo se calculó aproximadamente en 8g/l utilizando SDS-PAGE. La cantidad total de QB se estimó en aproximadamente 300g para esta ejecución del reactor.

**Ejemplo 15****Efecto de la alimentación exponencial extendida**

La fase de alimentación exponencial para fermentaciones realizó según los Ejemplos 6 ó 14 fue de 7 horas. Después de este tiempo las células alcanzaron una densidad para la inducción, que aumentó durante la inducción al OD<sub>600</sub> máximo objetivo de aproximadamente 100 a 130 como densidad celular final. OD<sub>600</sub> final, CWW final, CDW final, la retención de plásmido al comienzo de la inducción y la cosecha y concentración de QB al final del cultivo se determinaron para ejecuciones del reactor realizadas como se describe en los Ejemplos 6 y 14, preferentemente en el Ejemplo 14, en donde la fase de alimentación exponencial se extiende a una duración de hasta 11 horas, preferentemente hasta 10 horas.

**Ejemplo 16****Efecto de la alimentación incrementada durante la producción**

El ejemplo 9 demuestra que el glicerol no se acumula durante la fase de producción, lo cual indica que la producción puede limitarse por la tasa de alimentación del medio de inducción. Efecto de la tasa de alimentación extendida del medio de inducción en el OD<sub>600</sub> final, CWW final, CDW final, la retención de plásmido al comienzo de la inducción y cosecha y la concentración de QB al final del cultivo se determina en ejecuciones del reactor como se describe en los Ejemplos 6 y 14, preferentemente en el Ejemplo 14, en donde aumenta la tasa de alimentación durante la producción. De manera alternativa o adicional, la proporción entre lactosa y glicerol en el medio de alimentación cambió hacia una mayor concentración de glicerol y una menor concentración de lactosa.

**Ejemplo 17****Análisis HPLC de QB CP**

Se midió la QB CP con un sistema de HPLC de la siguiente manera: Se diluyó una muestra que contenía QB CP de manera apropiada en un tampón de reacción 1x (tampón de 50mM de tris(hidroximetil)aminometano pH 8,0) que contenía 10mM de 1,4-Ditio-DL-treitol y se incubó durante 15 minutos a 50°C en un termomezclador. Después de la incubación la muestra se centrifugó y el sobrenadante se almacenó a de 2°C a 10°C hasta el análisis HPLC. Se inyectó de 10 a 100µl de la muestra.

Se cuantificó QB con una curva de regresión de estándares conocidos de QB regresada al área pico de HPLC a 215nm después de la elución de columna de fase reversa C4 , 300 Å, 5µm, 4.6 x 150mm, Vydac Inc., Hesperia, USA (Cat. N° 214TP5415) equilibrada de manera térmica a 50°C. La tasa de flujo en todo el sistema fue de 1ml/min que consiste en una fase móvil A (0,12 % de ácido trifluoroacético en agua) y una fase móvil B (0,12 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo) con el siguiente gradiente de fase B: 0 a 2 minutos constante a 40%, 2 a 8 minutos de incremento lineal a 50%, 8 a 10 minutos constante at 50%, 10 a 10,1 minutos de descenso lineal a 40%, y 10,1 a 12 minutos constante a 40%.

**Ejemplo 18****Determinación de QB VLP por cromatografía analítica de exclusión por tamaños**

El análisis de partículas de QB por cromatografía analítica de exclusión por tamaños se realizó usando un TskgclG5000 PW<sub>XL</sub> de columnas (10µm, 7.8 x 300 mm, TosoH Biosep; Cat.-No. 08023) equilibrado en una solución salina tamponada (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150mM NaCl pH 7,2). La elución se realizó por gradiente isocrático durante 20 minutos a 0,8ml/min en solución salina tamponada en base a fosfato. La concentración de Qbcta se determinó a partir de una curva de regresión de estándares conocidos de QB regresado al área pico de HPLC detectada a 260nm.

**Ejemplo 19****Efecto de la alimentación exponencial extendida**

La fase de alimentación exponencial para fermentaciones realizó según los Ejemplos 6 ó 14 fue de 7 horas. Después de este tiempo las células alcanzaron una densidad para la inducción, que aumentó durante la inducción al OD<sub>600</sub> máximo objetivo de aproximadamente 100 a 130 como densidad celular final. OD<sub>600</sub> final, CWW final, la retención de plásmido antes de la inducción y al momento de la cosecha y la concentración de QB al final del cultivo se determinaron para ejecuciones del reactor realizadas como se describe en los Ejemplos 6 y 14, preferentemente en el Ejemplo 14, en donde la fase de alimentación exponencial se extiende a una duración de hasta 12 horas.

Además, las concentraciones de glicerol y lactosa en la alimentación de inducción se cambiaron a 300g/L y 100g/L respectivamente. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10: OD<sub>600</sub> y CWW al final de los cultivos, retención de plásmido antes de la inducción y al final de los cultivos y flujo de masa de oxígeno pico. Los cultivos se realizaron con diferente duración de alimentación exponencial.

Duración de la alimentación exponencial [h]	OD <sub>600</sub> [-]	CWW [g/L]	Retención de plásmido [%]		Flujo de masa de oxígeno pico [vvm]
			antes de la inducción	al final del cultivo	
7	86	122	100	99	0,2
8	112	184	99	98	0,4
9	136	217	100	98	0,8
10	164	228	99	98	1,5
11	200	292	100	97	>4,5
12	90	186	99	100	>4,5

- 5 Según el análisis LDS-PAGE, la concentración específica  $C_B$  de todos los cultivos fue la misma salvo por el cultivo con alimentación exponencial 12 b. Se encontró un valor óptimo de rendimiento  $\beta_{abs}$  absoluto y consumo de oxígeno para la alimentación exponencial de 9,5 horas. Por lo tanto, el proceso se ejecuta preferentemente con una fase de alimentación exponencial de 9,5 horas.

### Ejemplo 20

#### 10 Fermentación a mayor escala (501)

El proceso descrito en el Ejemplo 6 y con una fase de alimentación exponencial de 9,5 horas con 300g/L de glicerol y 100g/L de lactosa como se describe en el Ejemplo 19 se llevó a una escala mayor a un volumen de 50L para evaluar capacidad de aumentar la escala del sistema de bioreactor de volumen de 2L en funcionamiento a un mayor volumen. Los parámetros claves del proceso para el proceso a mayor escala se resumen en la Tabla 11.

15 Tabla 11: Parámetros del proceso en la escala de 50 L

Paso de cultivo	Descripción	Tiempo [h]
Precultivo	200µl del vial de banco celular se transfieren a un medio de precultivo de 800ml contenido en matraces oscilantes de 3000mL y cultivan durante 18 horas (2 matraces).	-18*
Inoculación de bioreactor	El volumen total combinado (aproximadamente 1,6L) se transfiere al bioreactor de 50L. Volumen inicial: = 35L	0
Comienzo de la inducción	El perfil de alimentación exponencial se cambió a constante y la alimentación se cambió a alimentación de inducción	16,5
Final del cultivo	El cultivo se completó después de 5 horas de inducción	21,5

\* En relación al tiempo de inoculación del bioreactor.

- 20 Fue necesario cambiar el procedimiento de precultivo para inocular el reactor mayor con aproximadamente la misma densidad celular. Los cultivos en los bioreactores de 50L se realizaron con el perfil de tiempo optimizado para la escala de 2L como se describe en el Ejemplo 19. El peso húmedo celular final para seis cultivos fue 188g/L \_ 9. La retención de plásmido fue 97,3% \_ 1,4 al final del cultivo. La concentración de la proteína QB CP en el medio al final del cultivo se determinó mediante HPLC de fase reversa C4 (Ejemplo 17) a 10,8g/L \_ 0,3. La cantidad total de QB CP fue de 540g para una ejecución de 50L. El extracto crudo de aproximadamente dos veces la biomasa concentrada se analizó para determinar QB CP y QB VLP (Ejemplo 18). La concentración de QB CP fue de 19,1g/L\_ 0.4 (HPLC de fase inversa C4 ), la concentración de QB VLP fue de 18,8g/L \_ 1,1. Por lo tanto, el rendimiento de VLP del proceso de fermentación se estima en aproximadamente 9-11g/l de caldo de fermentación al momento de la cosecha.
- 25

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Cytos Biotechnology AG  
Emmerling, Marcel  
Hennecke, Frank  
Pfründer, Holger  
Rhiel, Martin  
Steiner, Philipp

10 <120> Proceso de fermentación escalable

<130> P1049PC00

15 <150> EP05011416.4  
<151> 2005-05-26

<150> EP05106729.6  
<151> 2005-07-21

20 <160> 40

<170> Patente en versión 3.3

25 <210> 1  
<211> 5579  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> plásmido

<400> 1

ES 2 369 405 T3

ggctgtgcag gtcgtaaate actgcataat tcgtgtcgct caaggcgac tcccgttctg 60  
 gataatgttt tttgcgccga catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctggt 120  
 gacaattaat catcggctcg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 180  
 ggaaacagaa ttctaaggag gaaaaaaaaa tggcaaaatt agagactggt actttaggta 240  
 acatcgggaa agatggaaaa caaactctgg tcctcaatcc gcgtggggta aatcccacta 300  
 acggcgttgc ctcgcttca caagcgggtg cagttcctgc gctggagaag cgtggtaccg 360  
 tttcggatc tcagccttct cgcaatcgta agaactacaa ggtccagggt aagatccaga 420  
 acccgaccgc ttgcaactgca aacggttctt gtgacccatc cgttactcgc caggcatatg 480  
 ctgacgtgac cttttcgttc acgcagtata gtaccgatga ggaacgagct tttgttcgta 540  
 cagagcttgc tgctctgctc gctagtcctc tgctgatcga tgctattgat cagctgaacc 600  
 cagcgtatta atgactgctc attgccggtg gtggctcagg gtcaaaaccc gatccggtta 660  
 ttccgatcc accgattgat ccgccgccag ggacaggtaa gtataacctgt cccttcgcaa 720  
 tttggtccct agaggagggt tacgagcctc ctactaagaa ccgaccgtgg cctatctata 780  
 atgctgttga actccagcct cgcgaatttg atgttgccct caaagatctt ttgggcaata 840  
 caaagtggcg tgattgggat tctcggctta gttataaccac gttccgcggt tgccgtggca 900

ES 2 369 405 T3

atggttatat tgacctgat ggcacttatac ttgctactga tcaggctatg cgtgatcaga 960  
 agtatgatat tcgcgagggc aagaaacctg gtgctttcgg taacattgag cgattcattt 1020  
 atcttaagtc gataaatgct tattgctctc ttagcgatat tgcggcctat cacgccgatg 1080  
 gcgtgatagt tggcttttgg cgcgatccat ccagtggggtg tgccataccg tttgacttca 1140  
 ctaagtttga taagactaaa tgtcctattc aagccgtgat agtcgttcct cgtgcttagt 1200  
 aactaaggat gaaatgcatg tctaagcttg gctgttttgg cggatgagag aagattttca 1260  
 gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg 1320  
 gcagtagcgc ggtgggtcca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg 1380  
 ccgatggtag tgtggggctc ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa 1440  
 cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgc ggtgaacgct 1500  
 ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccggg 1560  
 ggggtggcggg caggacgcc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 1620  
 ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttttgt ttattttct agagccacgt 1680  
 tgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat 1740  
 aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggagtgtt atgagccata ttcaacggga 1800  
 aacgtcttgc tcgagggcgc gattaaatc caacatggat gctgatttat atgggtataa 1860  
 atgggctcgc gataatgctg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt atgggaagcc 1920  
 cgatgcgcca gagttgtttc tgaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga 1980  
 tgagatggtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt 2040  
 tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggga aaacagcatt 2100  
 ccaggtatta gaagaatatac ctgattcagg tgaatatatt gttgatgcgc tggcagtgtt 2160  
 cctgcgccgg ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct ttaacagcg atcgcgtatt 2220  
 tcgtctcgtc caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga 2280  
 tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata agcttttgcc 2340  
 attctcaccg gattcagtcg tcactcatgg tgattttctca cttgataacc ttatttttga 2400  
 cgaggggaaa ttaatagggtt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca 2460  
 ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ctttcattac agaaacggct 2520  
 ttttcaaaaa tatggtattg ataatcctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct 2580  
 cgatgagttt ttctaaccgc gtgaccaagt ttactcatat gtactttaga ttgatttaaa 2640  
 acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 2700  
 aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 2760

ES 2 369 405 T3

atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaaca aaaaaccacc 2820  
 gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac 2880  
 tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca 2940  
 ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatec tgttaccagt 3000  
 ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc 3060  
 ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg 3120  
 aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 3180  
 cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 3240  
 gagggagctc ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 3300  
 ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc 3360  
 cagcaacgcg gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt 3420  
 tcctgcgta tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 3480  
 cgctcgcgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 3540  
 cctgatgcgg tattttctcc ttacgcctct gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac 3600  
 tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaaagccag tatacactcc gctatcgcta 3660  
 cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg 3720  
 gcttgtctgc tccccgcctc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg 3780  
 tgtcagaggt tttcacgctc atcaccgaaa cgcgcgaggc agctgcggtg aagctcatca 3840  
 gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct gcctgttcat ccgctccag ctctgtgagt 3900  
 ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt 3960  
 tcctgtttgg tcaactgatgc ctccgtgtaa gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata 4020  
 ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgccccgta 4080  
 ctggaacggt gtgagggtaa acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc 4140  
 actcagggtc aatgccagcg cttcgttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag 4200  
 cagcatcctg cgatgcagat ccggaacata atggtgcagg gcgctgactt ccgctttcc 4260  
 agactttacg aaacacggaa accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacggt 4320  
 ttgcagcagc agtcgcttca cgttcgtctg cgtatcgggt attcattctg ctaaccagta 4380  
 aggcaacccc gccagcctag ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt 4440  
 ggccaggacc caacgctgcc cgagatgcgc cgcgtgcggc tgctggagat ggcggacgcg 4500  
 atggatatgt tctgccaagg gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg 4560  
 gctccaattc ttggagtggg gaatccgta gcgaggtgcc gccggcttcc attcaggtcg 4620

ES 2 369 405 T3

aggtggcccg gctccatgca ccgcgacgca acgcggggag gcagacaagg tatagggcgg 4680  
 cgcctacaat ccatgccaac ccgttccatg tgctcgccga ggcggcataa atcgccgtga 4740  
 cgatcagcgg tccaatgatc gaagttaggc tggtaagagc cgcgagcgat ccttgaagct 4800  
 gtcctgatg gtcgtcatct acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcattcccga 4860  
 tgccgcccga agcgagaaga atcataatgg ggaaggccat ccagcctcgc gtcgpgaacg 4920  
 ccagcaagac gtagcccagc gcgtcggccc ccatgccggc gataatggcc tgcttctcgc 4980  
 cgaaacgttt ggtggcggga ccagtgacga aggettgage gagggcgtgc aagattccga 5040  
 ataccgcaag cgacaggccg atcatcgtcg cgtccagcgg aaagcgggtcc tcgccgaaaa 5100  
 tgaccagag cgctgccggc acctgtccta cgagttgcat gataaagaag acagtcataa 5160  
 gtgcggcgac gatagtcatg ccccgcgccc accggaagga gctgactggg ttgaaggctc 5220  
 tcaagggcat cggtcgacgc tctcccttat gcgactcctg cattaggaag cagcccagta 5280  
 gtaggttgag gccgttgagc accgccgccc caaggaatgg tgcatgcaag gagatggcgc 5340  
 ccaacagtcc cccggccacg gggcctgcca ccataccac gccgaaaca gcgctcatga 5400  
 gccgaaagtg gcgagcccga tcttccccat cggatgatgc ggcgatatag gcgccagcaa 5460  
 ccgcacctgt ggcgcccgtg atgccggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atccgggctt 5520  
 atcgactgca cggtgacca atgcttctgg cgtcaggcag ccatcggaag ctgtggtat 5579

<210> 2  
 <211> 245  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> secuencia promotora

<400> 2

cgactgcacg gtgcaccaat gcttctggcg tcaggcagcc atcggaagct gtggtatggc 60  
 tgtgcaggtc gtaaactact gcataattcg tgctcgtcaa ggcgcactcc cgttctggat 120  
 aatgtttttt gcgccgacat cataacggtt ctggcaaata ttctgaaatg agctgttgac 180  
 aattaatcat cggctcgtat aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga 240  
 aacag 245

10 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN

<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> Secuencia de Shine-Dalgarno  
5 <400> 3  
taaggaggaa aaaaaaatg 19  
  
10 <210> 4  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
  
15 <220>  
<223> Secuencia de Shine-Dalgarno  
  
<400> 4  
aggaggtaaa aaacgatg 18  
  
20 <210> 5  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago Qbeta  
  
25 <400> 5

ES 2 369 405 T3

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser  
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu  
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln  
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr  
 130

- <210> 6
- <211> 1017
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Constructo de expresión

<400> 6

ES 2 369 405 T3

atggcaaaat tagagactgt tacttttaggt aacatcggga aagatggaaa acaaactctg 60  
 gtcctcaatc cgcgtggggg aaatcccact aacggcggtg cctcgctttc acaagcgggt 120  
 gcagttcctg cgctggagaa gcgtgttacc gtttcggtat ctcagccttc tcgcaatcgt 180  
 aagaactaca aggtccaggt taagatccag aacccgaccg cttgcactgc aaacggttct 240  
 tgtgacccat ccgttactcg ccaggcatat gctgacgtga ccttttcggt cacgcagtat 300  
 agtaccgatg aggaacgagc ttttgttcgt acagagcttg ctgctctgct cgctagtcct 360  
 ctgctgatcg atgctattga tcagctgaac ccagcgtatt aatgactgct cattgccggg 420  
 ggtggctcag ggtcaaaacc cgatccgggt attccggatc caccgattga tccgccgcca 480  
 gggacaggtg agtatacctg tcccttcgca atttggtccc tagaggaggt ttacgagcct 540  
 cctactaaga accgaccgtg gcctatctat aatgctggtg aactccagcc tcgccaattt 600  
 gatgttgccc tcaaagatct tttgggcaat acaaagtggc gtgattggga ttctcggctt 660  
 agttatacca cgttccgcgg ttgccgtggc aatggttata ttgacctga tgcgacttat 720  
 cttgctactg atcaggctat gcgtgatcag aagtatgata ttgcgagagg caagaaacct 780  
 ggtgctttcg gtaacattga gcgattcatt tatcttaagt cgataaatgc ttattgctct 840  
 cttagcgata ttgcggccta tcacgccgat ggcgtgatag ttggcttttg gcgcgatcca 900  
 tccagtggtg gtgccatacc gtttgacttc actaagtttg ataagactaa atgtcctatt 960  
 caagccgtga tagtcgttcc tcgtgcttag taactaagga tgaaatgcat gtctaag 1017

<210> 7

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 7

ES 2 369 405 T3

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 8  
<211> 132  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago Qbeta

5

<400> 8

ES 2 369 405 T3

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 9

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qb

<400> 9

5

ES 2 369 405 T3

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

- <210> 10
- <211> 132
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago Qbeta

5

<400> 10

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

ES 2 369 405 T3

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 11

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

5

<400> 11

ES 2 369 405 T3

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 12

<211> 131

<212> PRT

<213> Bacteriófago AP205

5

<400> 12

ES 2 369 405 T3

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
115 120 125

Thr Thr Ala  
130

<210> 13  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago AP205

5

<400> 13

Met Ala Asn Lys Thr Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu

ES 2 369 405 T3

20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
115 120 125

Thr Thr Ala  
130

<210> 14  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago AP205

5

<400> 14

ES 2 369 405 T3

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asp Lys Ile  
 1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
 20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
 35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
 50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
 65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
 85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
 100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
 115 120 125

Thr Thr Ala  
 130

- <210> 15
- <211> 329
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago Qbeta

5

<400> 15

ES 2 369 405 T3

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser  
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu  
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln  
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro  
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu  
 165 170 175

ES 2 369 405 T3

Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala  
 180 185 190

Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu  
 195 200 205

Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr  
 210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr  
 225 230 235 240

Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu  
 245 250 255

Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu  
 260 265 270

Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His  
 275 280 285

Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly  
 290 295 300

Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile  
 305 310 315 320

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala  
 325

- <210> 16
- <211> 129
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago R17

5

<400> 16

ES 2 369 405 T3

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala  
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu  
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
115 120 125

Tyr

- <210> 17
- <211> 130
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago fr
- <400> 17

5

ES 2 369 405 T3

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu  
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe  
 85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr  
 100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
 115 120 125

Ile Tyr

130

<210> 18

<211> 130

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago GA

<400> 18

ES 2 369 405 T3

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr  
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser  
65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe  
100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe  
115 120 125

Tyr Ala  
130

<210> 19  
<211> 132  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago SP

5

<400> 19

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg

ES 2 369 405 T3

35

40

45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys  
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe  
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

- <210> 20
- <211> 329
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago

5

<400> 20

ES 2 369 405 T3

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val  
 50 55 60

Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp  
 65 70 75 80

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr  
 85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala  
 100 105 110

ES 2 369 405 T3

Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn  
 115 120 125

Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp  
 130 135 140

Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro  
 145 150 155 160

Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly  
 165 170 175

Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg  
 180 185 190

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
 195 200 205

Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp  
 210 215 220

Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp  
 225 230 235 240

Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly  
 245 250 255

Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu  
 260 265 270

Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala  
 275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
 290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro  
 305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser  
 325

ES 2 369 405 T3

<210> 21  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 5 <213> Bacteriófago MS2

<400> 21

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu  
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe  
 85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu  
 100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
 115 120 125

Ile Tyr  
 130

<210> 22  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 10 <213> Bacteriófago M11

<400> 22

ES 2 369 405 T3

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly  
 1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr  
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser  
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu  
 100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn  
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr  
 130

- <210> 23
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago MX1

5

<400> 23

ES 2 369 405 T3

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly  
 1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr  
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu  
 100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn  
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 24

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago NL95

<400> 24

ES 2 369 405 T3

Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly  
1 5 10 15

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe  
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly  
130 135 140

Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro  
145 150 155 160

Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly  
165 170 175

Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys  
180 185 190

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
195 200 205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp  
210 215 220

ES 2 369 405 T3

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp  
 225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp  
 245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr  
 260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala  
 275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
 290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro  
 305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu  
 325 330

<210> 25  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago f2

5

<400> 25

ES 2 369 405 T3

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala  
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu  
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
115 120 125

Tyr

- <210> 26
- <211> 128
- <212> PRT
- <213> Bacteriófago PP7

5

<400> 26

ES 2 369 405 T3

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu  
1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val  
20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn  
35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp  
50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg  
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr  
85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala  
100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg  
115 120 125

<210> 27

<211> 4586

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> Vector de clonación

<400> 27

ttctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacattata cgagccgatg 60

attaattgtc aacagctcat ttcagaatat ttgccagaac cgttatgatg tcggcgcaaa 120

aaacattatc cagaacggga gtgcgcttg agcgacacga attatgcagt gatttacgac 180

ES 2 369 405 T3

ctgcacagcc ataccacagc ttccgatggc tgcctgacgc cagaagcatt ggtgcaccgt 240  
 gcagtcgata agctccggat cctctacgcc ggacgcacgc tggccggcat caccggcgcc 300  
 acaggtgcgg ttgctggcgc ctatategcc gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc 360  
 cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg 420  
 ggactggttg gcgccatctc cttgcatgca ccattccttg cggcggcggg gctcaacggc 480  
 ctcaacctac tactgggctg cttcctaagc caggagtcgc ataagggaga gcgtcgaccg 540  
 atgcccttga gagccttcaa cccagtcagc tccttccggg gggcgcgggg catgactatc 600  
 gtcgccgcac ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg 660  
 ctctgggtca ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg 720  
 cttgcgggat tcggaatctt gcacgcctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgcacc 780  
 aaacgtttcg gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccgacgc gctgggctac 840  
 gtcttgctgg cgttcgcgac gcgaggettg atggccttcc ccattatgat tcttctcgt 900  
 tccggcggca tcgggatgcc cgcggtgcag gccatgctgt ccaggcaggt agatgacgac 960  
 catcagggac agcttcaagg atcgcctcgc gctcttacca gcctaacttc gatcactgga 1020  
 ccgctgatcg tcacggcgat ttatgccgcc tcggcgagca catggaacgg gttagcatgg 1080  
 attgtaggcg ccgccctata ccttgtctgc ctccccgct tgcgtcgcgg tgcatggagc 1140  
 cgggccacct cgacctgaat ggaagccggc ggcacctcgc taacggattc accactcaa 1200  
 gaattggagc caatcaattc ttgcggagaa ctgtgaatgc gaaaccaac ccttggcaga 1260  
 acatatccat cgcgtccgcc atctccagca gccgcacgcg gcgcatctcg ggcagcgttg 1320  
 ggtcctggcc acgggtgcgc atgatcgtgc tcctgtcgtt gaggaccgg ctaggctggc 1380  
 ggggttgcc tactggttag cagaatgaat caccgatacg cgagcgaacg tgaagcgact 1440  
 gctgctgcaa aacgtctcgc acctgagcaa caacatgaat ggtcttcggg ttccgtgttt 1500  
 cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtcagcgc cctgcacat tatgttccgg atctgcatcg 1560  
 caggatgctg ctggctacc tgtggaacac ctacatctgt attaacgaag cgctggcatt 1620  
 gaccctgagt gatTTTTtctc tggteccgcc gcateccatac cggcagttgt ttaccctcac 1680  
 aacgttccag taaccgggca tgttcatcat cagtaaccgg tatcgtgagc atcctctctc 1740  
 gtttcatcgg tatcattacc cccatgaaca gaaattcccc cttacacgga ggcatcaagt 1800  
 gaccaaacag gaaaaaacg cccttaacat ggcccccttt atcagaagcc agacattaac 1860  
 gcttctggag aaactcaacg agctggacgc ggatgaacag gcagacatct gtgaatcgct 1920  
 tcacgaccac gctgatgagc tttaccgcag ctgcctcgcg cgtttcggtg atgacgggta 1980  
 aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg 2040

ES 2 369 405 T3

gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgtggc ggggtgctggg gcgcagccat 2100  
gaccagtcga cgtagcgata gcggagtgta tactggctta actatgcggc atcagagcag 2160  
attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 2220  
taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcggtcgg 2280  
ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac ggttatccac agaatacaggg 2340  
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaaag 2400  
gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 2460  
cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 2520  
ggaagctccc tcgtgcgctc tectgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 2580  
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg 2640  
gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 2700  
tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca 2760  
ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 2820  
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 2880  
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttgtagct cttgatccgg caaacaacc 2940  
accgctggta gcggtggtt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgag aaaaaagga 3000  
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcaaggaa cgaaaactca 3060  
cgtaagggg ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat 3120  
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 3180  
caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcggtc atccatagtt 3240  
gcctgactcc ccgctcgtga gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt 3300  
gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggtccag atttatcagc aataaaccag 3360  
ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 3420  
attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt 3480  
gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 3540  
tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcggtt 3600  
agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcaactcag 3660  
gttatggcag cactgcataa ttctctact gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg 3720  
actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct 3780  
tgccccgct caacacggga taataccgcy ccacatagca gaactttaa agtgctcatc 3840  
attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 3900

ES 2 369 405 T3

tcgatgtaac ccaactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 3960  
 tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg 4020  
 aatggtgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 4080  
 tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaaa gagttttag 4140  
 aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta atttgatgcc tggcagttta 4200  
 tggcggggcgt cctgcccgcc accctccggg ccggtgcttc gcaacgttca aatccgctcc 4260  
 cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa caacagataa aacgaaaggc 4320  
 ccagtctttc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg gcagttccct actctcgcac 4380  
 ggggagaccc cacactacca tcggcgctac ggcgtttcac ttctgagttc ggcaggggt 4440  
 caggtgggac caccgcgcta ctgccgccag gcaaattctg ttttatcaga ccgcttctgc 4500  
 gttctgattt aatctgtatc aggctgaaaa tcttctctca tccgccaaaa cagaagcttg 4560  
 gctgcaggtc gacggatccc cgggaa 4586

<210> 28  
 <211> 425  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia finalizador  
 <400> 28

ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag 60  
 cggctctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtcccac ctgaccccat 120  
 gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc cccatgcgag 180  
 agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc 240  
 gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg 300  
 atttgaacgt tgcaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg 360  
 ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cttttttgcg tttctacaaa 420  
 ctctt 425

10 <210> 29  
 <211> 816  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

ES 2 369 405 T3

<220>  
<223> Gen de resistencia

5 <400> 29

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat	60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggaggttcca	120
taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc	180
taitaatbbc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac	240
tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca	300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaaa ccgttattca ttcgtgattg	360
cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgcg gttaaaagga caattacaaa caggaatcga	420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata	480
ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc ggggatcgcg gtggtgagta accatgcatc	540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaaaggc ataaattccg tcagccagtt	600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa	660
caactctggc gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgcg	720
attatcgcga gccatttat acccatataa atcagcatcc atggttggaa ttaatcgcgg	780
cctcagcaaa gacgtttccc gttgaaatg gctcat	816

<210> 30  
<211> 4963  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10

<220>  
<223> plásmido  
<400> 30

ES 2 369 405 T3

ggctgtgcag gtcgtaaate actgcataat tcgtgtcgct caagggcgac tcccgttctg 60  
 gataatgttt ttgcgccga catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctggt 120  
 gacaattaat catcggctcg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 180  
 ggaaacagaa ttctaaggag gaaaaaaaaa tggcaaataa gccaatgcaa ccgatcacat 240  
 ctacagcaaa taaaattgtg tggtcggatc caactcgttt atcaactaca ttttcagcaa 300  
 gtctgttacg ccaacgtggt aaagttggta tagccgaact gaataatggt tcaggtcaat 360  
 atgtatctgt ttataagcgt cctgcaccta aaccggaagg ttgtgcagat gcctgtgtca 420  
 ttatgccgaa tgaaaaccaa tccattcgca cagtgatctc agggtcagcc gaaaacttgg 480  
 ctaccttaaa agcagaatgg gaaactcaca aacgtaacgt tgacacactc ttcgcgagcg 540  
 gcaacgccgg ttggtgtttc cttgacccta ctgcggtat cgtatcgtct gatactactg 600  
 cttaatgaag cttggctggt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa 660  
 atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgctt ggcggcagta gcgcggtggt 720  
 cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgccgatg gtagtgtggg 780

ES 2 369 405 T3

gtctcccat gcgagagtag ggaactgcca ggcatacaat aaaacgaaag gctcagtcga 840  
 aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa 900  
 atccgccggg agcggatttg aacgttgcga agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac 960  
 gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt 1020  
 ttgcgtttct aaaaactcct ttgtttatth ttctagagcc acgttgtgtc tcaaaatctc 1080  
 tgatgttaca ttgcacaaga taaaaatata tcatcatgaa caataaaaact gtctgcttac 1140  
 ataaacagta atacaaggag tgttatgagc catattcaac gggaaacgtc ttgctcgagg 1200  
 ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataatgggc tcgcgataat 1260  
 gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc gccagagttg 1320  
 tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgta cagatgagat ggtcagacta 1380  
 aactggtga cggaaattht gcctcttccg accatcaagc attttatccg tactcctgat 1440  
 gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc gggaaaacag cattccaggt attagaagaa 1500  
 tatectgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttctcgcg ccggttgcat 1560  
 tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct cgctcaggcg 1620  
 caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga gcgtaatggc 1680  
 tggcctggtg aacaagtctg gaaagaaatg cataagcttt tgccattctc accggattca 1740  
 gtcgtcactc atggtgattt ctacttgat aaccttattt ttgacgaggg gaaattaata 1800  
 ggttgattg atgttgagc agtcggaatc gcagaccgat accaggatct tgccatccta 1860  
 tggaaactgc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca aaaatatggt 1920  
 attgataatc ctgatatgaa taaattgcag ttccatttga tgctcgatga gtttttctaa 1980  
 acgcgtgacc aagtttactc atatgtactt tagattgatt taaaacttca tttttaatth 2040  
 aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2100  
 ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2160  
 tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt 2220  
 tgtttgccgg atcaagagct accaactcct tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 2280  
 cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 2340  
 gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 2400  
 gataagtctg gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggccagcgg 2460  
 tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 2520  
 ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 2580  
 gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gctcccaggg 2640

ES 2 369 405 T3

ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 2700  
 tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcgcctttt 2760  
 ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct 2820  
 gattctgtgg ataaccgat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga 2880  
 acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcctgat gcggtatttt 2940  
 ctccctacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcataatgg gcaactctcag tacaatctgc 3000  
 tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg 3060  
 ctgcgccccg acaccgccca acaccgctg acgcgccttg acgggcttgt ctgctcccgg 3120  
 catccgctta cagacaaget gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac 3180  
 cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg 3240  
 attcacagat gtctgcctgt tcatccgcgt ccagctcgtt gagtttctcc agaagcgta 3300  
 atgtctggct tctgataaag cgggccatgt taagggcggt tttttcctgt ttggtcactg 3360  
 atgcctccgt gtaaggggga tttctgttca tgggggtaat gataccgatg aaacgagaga 3420  
 ggatgctcac gatacggggt actgatgatg aacatgcccg gttactggaa cgttgtgagg 3480  
 gtaaacaact ggcggtatgg atgcggcggg accagagaaa aatcactcag ggtcaatgcc 3540  
 agcgttctgt taatacagat gtagggttcc cacagggtag ccagcagcat cctgcgatgc 3600  
 agatccggaa cataatgggt cagggcgctg acttccgcgt ttccagactt tacgaaacac 3660  
 ggaaaccgaa gaccattcat gttgttgcct aggtcgcaga cgttttgtag cagcagtcgc 3720  
 ttcacgttcg ctgcgctatc ggtgattcat tctgctaacc agtaaggcaa ccccgccagc 3780  
 ctagccgggt cctcaacgac aggagcacga tcatgcgcac ccgtggccag gaccaacgc 3840  
 tgcccagat gcgcccgtg cggtctctgg agatggcgga cgcgatggat atgttctgcc 3900  
 aagggttggg ttgcgcattc acagttctcc gcaagaattg attggctcca attcttgagg 3960  
 tgggtaatcc gtttagcgagg tgccgcccgc ttccattcag gtcgaggtgg cccggctcca 4020  
 tgcaccgca cgcaacgcgg ggaggcagac aaggtatagg gcgggccta caatccatgc 4080  
 caaccgctc catgtgctcg ccgagggcgc ataaatcgcc gtgacgatca gcggtccaat 4140  
 gatcgaagt aggctggtaa gagccgcgag cgatccttga agctgtccct gatggtcgtc 4200  
 atctacctgc ctggacagca tggcctgcaa cgcgggcata ccgatgccgc cggaagcgag 4260  
 aagaatcata atggggaagg ccatccagcc tcgcgtcgcg aacgccagca agacgtagcc 4320  
 cagcgcgtcg gccgccatgc cggcgataat ggctgcttc tcgccgaaac gtttgggtggc 4380  
 gggaccagt acgaaggctt gagcgagggc gtgcaagatt ccgaataccg caagcgacag 4440  
 gccgatcacc gtcgcgctcc agcgaaagcg gtectcgccc aaaatgacct agagcgtctc 4500

ES 2 369 405 T3

cggcacctgt cctacgagtt gcatgataaa gaagacagtc ataagtgcgg cgacgatagt 4560  
 catgccccgc gccaccgga aggagctgac tgggttgaag gctctcaagg gcatcggtcg 4620  
 acgctctccc ttatgcgact cctgcattag gaagcagccc agtagtaggt tgaggccggt 4680  
 gagcaccgcc gccgcaagga atggtgcatg caaggagatg gcgcccaaca gtccccggc 4740  
 cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc 4800  
 ccgatcttcc ccatcgggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc 4860  
 ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatccgg gcttatcgac tgcacggtgc 4920  
 accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tat 4963

<210> 31  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Codón finalizador

<400> 31  
 tgaaca 6

10

<210> 32  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Codón finalizador

<400> 32  
 taatga 6

20

<210> 33  
 <211> 4525  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

25

<220>  
 <223> plásmido

30

<400> 33

ES 2 369 405 T3

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggccc 240  
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300  
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt 360

ES 2 369 405 T3

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cagacatgca tttcatcctt 420  
 agttactaag cacgaggaac gactatcacg gcttgaatag gacatttagt cttatcaaac 480  
 ttagtgaagt caaacggtat ggcaccacca ctggatggat cgcgccaaaa gccaaactatc 540  
 acgccatcgg cgtgataggc cgcaatatcg ctaagagagc aataagcatt tatcgactta 600  
 agataaatga atcgctcaat gttaccgaaa gcaccagggt tcttgccctc gcgaatatca 660  
 tacttctgat cacgcatagc ctgatcagta gcaagataag tcgcatcaag gtcaatataa 720  
 ccattgccac ggcaaccgcg gaacgtggtg taactaagcc gagaatccca atcacgccac 780  
 tttgtattgc caaaagatc tttgagggca acatcaaatt cgcgaggctg gagttcaaca 840  
 gcattataga taggccacgg tcggttctta gtaggaggct cgtaaacctc ctctagggac 900  
 caaattgcga agggacaggt atacttacct gtccctggcg gcggatcaat cggtgatcc 960  
 ggaataaccg gatcgggttt tgacctgag ccaccaccgg caatgagcag tcattaatac 1020  
 gctgggttca gctgatcaat agcatcgatc agcagaggac tagcgagcag agcagcaagc 1080  
 tctgtacgaa caaaagctcg ttcctcatcg gtactatact gcgtgaacga aaaggtcacg 1140  
 tcagcatatg cctggcgagt aacggatggg tcacaagaac cgtttgcagt gcaagcggtc 1200  
 gggttctgga tcttaacctg gacctgtag ttcttacgat tgcgagaagg ctgagatacc 1260  
 gaaacggtaa cacgcttctc cagcgcagga actgcaccgg cttgtgaaag cgaggcaacg 1320  
 ccgttagtgg gatttacctc acgcggattg aggaccagag tttgttttcc atctttcccg 1380  
 atgttaccta aagtaacagt ctctaatttt gccatcgttt tttacctcct tctagagtca 1440  
 ttatggtttt gccatacatc agtatggtgt agcagcactt attataatct ttattgcctc 1500  
 ttaaaactta atccacatca aaactcaaat acttttaacc ccagcgtcct gtaagctctg 1560  
 cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct 1620  
 tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac 1680  
 tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 1740  
 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 1800  
 aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtacagag gtggcgaaac 1860  
 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct 1920  
 gtccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg 1980  
 ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 2040  
 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcy cttatccgg taactatcgt 2100  
 cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 2160  
 attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 2220

ES 2 369 405 T3

ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 2280  
 aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 2340  
 gtttgcaagc agcagattac ggcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 2400  
 tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga 2460  
 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 2520  
 taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 2580  
 atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata 2640  
 actacgatac gggagggcctt accatctggc cccagtgcctg caatgatacc gcgagaccca 2700  
 cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga 2760  
 agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccg ggaagctaga 2820  
 gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg 2880  
 gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 2940  
 gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt 3000  
 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct 3060  
 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtgggg gggggggggc 3120  
 ctgaggtctg cctcgtgaag aaggtggtgc tgactcatac caggcctgaa tcgccccatc 3180  
 atccagccag aaagtgaagg agccacggtt gatgagagct ttgtttagg tggaccagtt 3240  
 ggtgattttg aacttttgct ttgccacgga acggtctgcg ttgtcgggaa gatgcgtgat 3300  
 ctgatccttc aactcagcaa aagttcgatt tattcaaca agccgccgtc ccgtcaagtc 3360  
 agcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 3420  
 agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 3480  
 agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgagggcagt tccataggat ggcaagatcc 3540  
 tggatcgggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 3600  
 tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat 3660  
 ggcaaaagct tatgcatttc ttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 3720  
 tcaaaatcac tcgcatcaac caaacgtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga 3780  
 aatacgcgat cgctgttaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg 3840  
 aacactgcc a gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 3900  
 aatgctgttt tcccgggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 3960  
 aatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 4020  
 tctgtaacat cattggcaac gctacccttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacgc 4080

ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 4140  
 ttatacccat ataaatcagc atccatggtg gaatttaate gcggcctcga gcaagacggt 4200  
 tcccgttgaa tatggctcat aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt 4260  
 attgttcatg atgatatatt tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacaca 4320  
 acgtggcttt ccccccccc ccattattga agcatttate agggttattg tctcatgagc 4380  
 ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 4440  
 cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat 4500  
 aggcgatatca cgaggccctt tcgtc 4525

<210> 34  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia del cebador

<400> 34  
 gcgcgcaat tcaggagga aaaaacgatg gcaaaattag agactgttac ttagg 56

10

<210> 35  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia del cebador

<400> 35  
 gcatgcaagc ttagacatgc attcatcct tag 33

20

<210> 36  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Secuencia del cebador

<400> 36  
 gcgcgcaat tctaaggagg aaaaaaaaaat ggcaaaatta gagactgtta cttagg 57

30

<210> 37  
 <211> 3914  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Vector de clonación

40

<400> 37

ES 2 369 405 T3

tcgcgcgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacgggtca 60  
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
 accatatgcg gtgtgaaata ccgacacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
 attcgcatt caggctgcbc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300  
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360  
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt ccccgatcc gtcgacctgc 420  
 aggggggggg gggcgctgag gtctgcctcg tgaagaagggt gttgctgact cataccaggc 480  
 ctgaatcgcc ccatcatcca gccagaaagt gagggagcca cggttgatga gagctttggt 540  
 gtaggtggac cagttggtga ttttgaactt ttgctttgcc acggaacggg ctgcgttgtc 600  
 gggaaagatgc gtgatctgat ccttcaactc agcaaaagtt cgatttattc aacaaagccg 660  
 ccgtcccgtc aagtcagcgt aatgctctgc cagtgttaca accaattaac caattctgat 720  
 tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat tcatatcagg attatcaata 780  
 ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa actcaccgag gcagttccat 840  
 aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc gtccaacatc aatacaacct 900  
 attaatttc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact 960  
 gaatccggtg agaatggcaa aagcttatgc atttctttcc agacttgttc aacaggccag 1020  
 ccattacgct cgtcatcaaa atcaactcga tcaaccaaac cgttattcat tcgtgattgc 1080  
 gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtg ttaaaaggac aattacaaac aggaatcgaa 1140  
 tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat tttcacctga atcaggatat 1200  
 tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag tggtagtaa ccatgcatca 1260  
 tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca taaattccgt cagccagttt 1320  
 agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac ctttgccatg tttcagaaac 1380  
 aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg tcgcacctga ttgcccgaca 1440  
 ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca tgttggatt taatcgcggc 1500  
 ctcgagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac cccttgatt actgtttatg 1560  
 taagcagaca gttttattgt tcatgatgat atatttttat cttgtgcaat gtaacatcag 1620  
 agattttgag acacaacgtg gctttcccc cccccctgc aggtcgacgg atccggggaa 1680  
 ttcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 1740  
 caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag tgagctaact 1800  
 cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 1860

ES 2 369 405 T3

gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 1920  
 ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 1980  
 ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 2040  
 agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 2100  
 taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 2160  
 cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 2220  
 tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 2280  
 gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct 2340  
 gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 2400  
 tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 2460  
 gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 2520  
 cggctacact agaaggacag tatttgggat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg 2580  
 aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 2640  
 tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 2700  
 ttctacgggg tctgacgctc agtgaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 2760  
 attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 2820  
 ctaaagtata tatgagtaaa cttggcttga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 2880  
 tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 2940  
 aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 3000  
 acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 3060  
 aagtgtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggagctag 3120  
 agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 3180  
 ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 3240  
 agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 3300  
 tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc actcatgggt atggcagcac tgcataatc 3360  
 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 3420  
 attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 3480  
 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg 3540  
 aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc 3600  
 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 3660  
 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 3720

ES 2 369 405 T3

cccttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 3780  
 tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 3840  
 acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac 3900  
 gaggcccttt cgtc 3914

<210> 38  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia del cebador

<400> 38  
 gcgcgcaat tctaaggagg aaaaaaaaaat ggcaataag ccaatgcaac cgatcac 57

10

<210> 39  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia del cebador

<400> 39  
 gcatgcaagc ttcattaagc agtagtatca gacgatacga tagc 44

20

<210> 40  
 <211> 4962  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Constructo de expresión

30

<400> 40

ES 2 369 405 T3

ggctgtgcag gtcgtaaadc actgcataat tcgtgtcgct caaggcgcac tcccgttctg 60  
 gataatgttt ttgcgccga catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctggt 120  
 gacaattaat catcggctcg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 180  
 ggaaacagaa ttcaggaggt aaaaaacgat ggcaataag ccaatgcaac cgatcacatc 240  
 tacagcaaat aaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta tcaactacat tttcagcaag 300  
 tctgttacgc caacgtgta aagttggtat agccgaactg aataatgttt caggtaata 360  
 tgtatctggt tataagcgtc ctgcaccta accggaaggt tgtgcagatg cctgtgtcat 420  
 tatgccgaat gaaaaccaat ccattcgcac agtgatttca gggtcagccg aaaacttggc 480  
 taccttaaaa gcagaatggg aaactcacia acgtaacggt gacacactct tcgagagcgg 540  
 caacgccggt ttgggttcc ttgaccctac tgcggctatc gtatcgtctg atactactgc 600

ES 2 369 405 T3

ttaatgaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa 660  
 tcagaacgca gaagcggctc gataaaacag aatttgccctg gcggcagtag cgcggtggtc 720  
 ccacctgacc ccatgccgaa ctcagaagtg aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg 780  
 tctccccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa 840  
 agactgggccc tttcgtttta tctgttgttt gtcggtgaac gctctcctga gtaggacaaa 900  
 tccgccggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc ggaggggtggc gggcaggacg 960  
 cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt 1020  
 tgcgtttcta caaactcttt tgtttatfff tctagagcca cgttgtgtct caaaatctct 1080  
 gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg tctgcttaca 1140  
 taaacagtaa tacaaggagt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct tgctcgaggc 1200  
 cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg 1260  
 tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt 1320  
 ttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa 1380  
 actggctgac ggaatztatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg 1440  
 atgcatggtt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta ttagaagaat 1500  
 atcctgattc aggtgaaaat atgttgatg cgctggcagt gttcctgcbc cggttgcatt 1560  
 cgattcctgt ttgtaattgt ctttttaaca gcgatcgcgt atttctgtctc gctcaggcgc 1620  
 aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct 1680  
 ggctcttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca ccggattcag 1740  
 tcgtcactca tgggtatttc tcaactgata accttatfff tgacgagggg aaattaatag 1800  
 gttgtattga tgttgacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat 1860  
 ggaactgcct cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta 1920  
 ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaaa 1980  
 cgcgtgacca agtttactca tatgtacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 2040  
 aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 2100  
 tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 2160  
 tttttctgcg cgtaactctc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 2220  
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 2280  
 agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 2340  
 tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtgccg 2400  
 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg 2460

ES 2 369 405 T3

cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcaaacgacc tacaccgaac 2520  
 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 2580  
 acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag ctcccagggg 2640  
 gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 2700  
 ttttgtgatg ctctgcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgcagcaac gcggcctttt 2760  
 tacggttctt ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgctg ttatcccctg 2820  
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 2880  
 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcctgatg cggtatcttc 2940  
 tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatgggt cactctcagt acaatctgct 3000  
 ctgatgccgc atagttaagc cagtatacac tccgctatcg ctacgtgact gggcatgccc 3060  
 tgcgccccga caccgcgcaa caccgctga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc 3120  
 atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc 3180  
 gtcatcaccg aaacgcgcca ggagctgctg gtaaagctca tcagcgtggt cgtgaagcga 3240  
 ttcacagatg tctgcctggt catccgcgct cagctcgttg agtttctcca gaagcgttaa 3300  
 tgtctggctt ctgataaagc gggccatggt aagggcgggt ttttctggtt tggctactga 3360  
 tgctccctg taaggggat tctgttcat ggggtaatg ataccgatga aacgagagag 3420  
 gatgctcagc atacgggta ctgatgatga acatgcccgg ttactggaac gttgtgaggg 3480  
 taacaactg gcggtatgga tgcggcggga ccagagaaaa atcactcagg gtcaatgcca 3540  
 gcgcttcggt aatacagatg taggtgttcc acagggtagc cagcagcctc ctgcgatgca 3600  
 gatccggaac ataatggtgc agggcgctga cttccgcggt tccagacttt acgaaacacg 3660  
 gaaaccgaag accattcatg ttgttgctca ggtcgcagac gttttgcagc agcagtcgct 3720  
 tcacgttcgc tcgctgatcg gtgattcatt ctgctaacca gtaaggcaac cccgccagcc 3780  
 tagccgggtc ctcaacgaca ggagcacgat catgcgcacc cgtggccagg acccaacgct 3840  
 gcccgagatg cgcgcgctgc ggctgctgga gatggcggac gcgatggata tgttctgcca 3900  
 agggttggtt tgcgcattca cagttctccg caagaattga ttggctcaa ttcttgaggt 3960  
 ggtgaatccg ttagcgaggt gccgccgct tccattcagg tcgaggtggc ccggctccat 4020  
 gcaccgcgac gcaacgcggg gaggcagaca aggtataggg cggcgcctac aatccatgcc 4080  
 aaccggttcc atgtgctcgc cgaggcgcca taaatcgccg tgacgatcag cggccaatg 4140  
 atcgaagtta ggctggtaag agccgcgagc gatcctttaa gctgtccctg atggctgtca 4200  
 tctacctgcc tggacagcat ggctgcaac gcgggcatcc cgatgccgcc ggaagcgaga 4260  
 agaatcataa tggggaaggc catccagcct cgcgtcgca acgccagcaa gacgtagccc 4320

ES 2 369 405 T3

agcgcgtcgg ccgccatgcc ggcgataatg gcctgcttct cgccgaaacg tttggtggcg 4380  
 ggaccagtga cgaaggcttg agcgagggcg tgcaagattc cgaataccgc aagcgacagg 4440  
 ccgatcatcg tcgcgctcca gcgaaagcgg tcctcgccga aatgaccca gagcgtgccc 4500  
 ggcacctgtc ctacgagttg catgataaag aagacagtca taagtgcggc gacgatagtc 4560  
 atgccccgcg cccaccgga ggagctgact gggttgaagg ctctcaaggg catcggtcga 4620  
 cgctctccct tatgcgactc ctgcattagg aagcagccca gtagtaggtt gaggccgttg 4680  
 agcaccgccg ccgcaaggaa tggatgatgc aaggagatgg cgcccaacag tccccggcc 4740  
 acggggcctg ccaccatacc cacgccgaaa caagcgtcga tgagcccga gtagccgagcc 4800  
 cgatcttccc catcggatgat gtcggcgata taggcgccag caaccgcacc tgtggcgccg 4860  
 gtgatgccgg ccacgatgcg tccggcgtag aggatccggg cttatcgact gcacggtgca 4920  
 ccaatgcttc tggcgtcagg cagccatcgg aagctgtggt at 4962

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para la expresión de una proteína de la cápside recombinante de un bacteriófago o un mutante o fragmento de la misma capaz de formar una VLP mediante auto-ensamblaje, en donde dicho bacteriófago es un bacteriófago de ARN, y en donde dicho proceso comprende los pasos de:

- 5 a.) introducir un plásmido de expresión en un huésped bacteriano, en donde dicho plásmido de expresión comprende un constructo de expresión, en donde dicho constructo de expresión comprende (i) una primera secuencia de nucleótido que codifica dicha proteína de la cápside recombinante, o mutante o fragmento de la misma, y (ii) un promotor que es inducible por lactosa;
- 10 b.) cultivar dicho huésped bacteriano en un medio que comprende una fuente de carbono principal; en donde dicha fuente de carbono principal es glucosa o glicerol; y en donde dicho cultivo se realiza en cultivo discontinuo y en condiciones bajo las cuales dicho promotor se reprime por lacl, en donde dicho lacl es sobreexpresado por dicho huésped bacteriano;
- c.) alimentar dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal; y
- 15 d.) inducir dicho promotor con un inductor, en donde se continúa dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicha fuente de carbono principal.

2. Proceso según la reivindicación 1, en donde dicho bacteriófago se selecciona del grupo que consiste en:

- a.) bacteriófago Q $\beta$ ;
- b.) bacteriófago AP205;
- c.) bacteriófago fr;
- 20 d.) bacteriófago GA;
- e.) bacteriófago SP;
- f.) bacteriófago MS2;
- g.) bacteriófago M11;
- h.) bacteriófago MX1;
- 25 i.) bacteriófago NL95;
- j.) bacteriófago f2;
- k.) bacteriófago PP7 y
- l.) bacteriófago R17.

30 3. Proceso según la reivindicación 1, en donde dicho bacteriófago es el bacteriófago Q $\beta$  o bacteriófago AP205, preferentemente bacteriófago Q $\beta$ .

4. Proceso según la reivindicación 1, en donde dicho bacteriófago es el bacteriófago Q $\beta$  y en donde dicha proteína de la cápside recombinante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

35 5. Proceso según la reivindicación 1, en donde dicho constructo de expresión comprende una primera secuencia de nucleótido y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica Q $\beta$  CP o un mutante o fragmento de la misma, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica la proteína A1 de Q $\beta$  o un mutante o fragmento de la misma, y en donde dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos están separadas exactamente por un tramo de secuencias que comprende al menos un codón finalizador TAA, y en donde preferentemente dicho constructo de expresión comprende o de manera alternativa consiste en la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO:6; y en donde más preferentemente dicho plásmido de expresión comprende o de  
40 manera preferente consiste en la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 1.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en:
- a.) promotor tac;
  - b.) promotor trc;
  - 5 c.) promotor tic;
  - d.) promotor lac;
  - e.) promotor lacUV5;
  - f.) promotor P<sub>syn</sub>;
  - g.) promotor lpp<sup>a</sup>;
  - 10 h.) promotor lpp-lac;
  - i.) promotor T7-lac;
  - j.) promotor T3-lac;
  - k.) promotor T5-lac; y
  - l.) un promotor que tiene al menos 50% de homología de secuencia a la SEQ ID NO:2;
- 15 y en donde preferente dicho promotor comprende la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO:2.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha fuente de carbono principal es glicerol; y en donde preferentemente dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza a una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial  $\mu$ , y en donde más preferentemente dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es inferior a  $\mu_{max}$ .
- 20 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha inducción de dicho promotor se realiza mediante la co-alimentación de dicho cultivo discontinuo con dicho inductor y dicha fuente de carbono principal a una tasa de flujo constante o a una tasa de flujo creciente.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho inductor es IPTG.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho inductor es lactosa.
- 25 11. Proceso según la reivindicación 8, en donde dicho inductor es lactosa, y en donde dicha lactosa y dicha fuente de carbono principal son co-alimentadas a dicho cultivo discontinuo en una proporción de 2:1 a 1:4 (w/w).
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho lacI es sobreexpresado por dicho huésped bacteriano, en donde dicha sobreexpresión es provocada por lacI<sup>q</sup> o lacQ1, preferentemente por lacI<sup>q</sup>.
- 30 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realiza a una temperatura que es inferior a la temperatura de crecimiento óptima de dicho huésped bacteriano, en donde preferentemente dicha temperatura se encuentra entre 27 y 32°C, más preferentemente entre 28 y 31°C en donde más preferentemente dicha temperatura es de 30°C.
14. Proceso según la reivindicación 1, en donde:
- a.) dicho plásmido de expresión comprende o preferentemente consiste en la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:1.
  - 35 b.) dicha fuente de carbono principal es glicerol;

- c.) dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial  $\mu$ , y en donde preferentemente dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es inferior a  $\mu_{\max}$ .
- d.) dicho inductor es lactosa;
- 5 e.) y dicha lactosa y dicha fuente de carbono principal son co-alimentadas a dicho cultivo discontinuo en una proporción de 2:1 a 1:4 (w/w), preferentemente de 1:1 a 1:3 (w/w), más preferentemente de 1:3 (w/w);
- f.) dicho huésped bacteriano es E. coli RB791; y
- g.) dicho cultivo y alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realizan a una temperatura de aproximadamente 30°C.
- 10 **15.** Proceso según la reivindicación 1, en donde:
- a.) dicho plásmido de expresión comprende o preferentemente consiste en la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:30.
- b.) dicha fuente de carbono principal es glicerol;
- 15 c.) dicha alimentación de dicho cultivo discontinuo se realiza con una tasa de flujo, en donde dicha tasa de flujo aumenta con un coeficiente exponencial  $\mu$ , y en donde preferentemente dicho coeficiente exponencial  $\mu$  es inferior a  $\mu_{\max}$ .
- d.) dicho inductor es lactosa;
- e.) dicha lactosa y dicha fuente de carbono principal son co-alimentadas a dicho cultivo discontinuo en una proporción de 2:1 a 1:4 (w/w), preferentemente de 1:1 a 1:3 (w/w), más preferentemente de 1:3 (w/w);
- 20 f.) dicho huésped bacteriano es E. coli RB791; y
- g.) dicho cultivo y alimentación de dicho cultivo discontinuo y dicha inducción de dicho promotor se realizan a una temperatura de aproximadamente 30°C.

Figura 1/1

Fermentación QT0602, Inducción con co-alimentación (20% glicerol + 20% lactosa)

