(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 394 668**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2009** **E 09010283 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **16.02.2011** **EP 2284273**

(54) Título: **Vector que comprende promotor de manosa y promotor de manosa**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2013

(73) Titular/es:

LONZA AG (100.0%)
Rottenstrasse 6/E3
3930 Visp VS , CH

(72) Inventor/es:

SUN, TIANQI;
ALTENBUCHNER, JOSEF y
KIZIAK, CHRISTOPH

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 394 668 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

Vector que comprende promotor de manosa y promotor de manosa

La presente invención se relaciona con vectores que se pueden expresar en células anfitrionas procarióticas que comprenden un promotor inducible por manosa para la expresión heteróloga de ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, polipéptidos tales como proteínas recombinantes.

En particular, la presente invención se relaciona con nuevos vectores para la expresión heteróloga en un anfitrión que comprende una región promotora del operón de manosa ligado en forma funcional a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es heteróloga a dicho anfitrión, mientras la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos se controla por dicha región promotora del operón de manosa. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con el uso de estos vectores para la expresión heteróloga de ácidos nucleicos que codifican por ejemplo polipéptidos tales como proteínas recombinantes.

Se han descrito muchos sistemas para la expresión heteróloga de ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, polipéptidos (genes estructurales) en sistemas procarióticos. Para esto, el anfitrión se transforma con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del gen estructural de interés ligado en forma funcional a un promotor que es una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el gen estructural sea transcrito. Mediante la inducción adecuada el promotor se activa y permite la transcripción del gen estructural. La inducción puede ser bajo control positivo o negativo.

En la inducción de control negativo un represor se une al promotor y evita la transcripción del gen estructural. Si está presente un inductor adecuado, se desactiva el represor y se permite la transcripción.

En la inducción de control positivo el promotor se activa luego de unión de un activador, en donde la unión del activador al promotor se media por un inductor adecuado.

Los inductores típicos pueden ser sustratos cuyos anfitriones procarióticos requieren metabolismo, por ejemplo, diferentes tipos de azúcares.

La presente invención se relaciona con sistemas positivamente inducibles, en donde en la presencia de un sustrato adecuado, es decir el inductor, un activador se une al promotor que inicia la transcripción de los genes ligados en forma funcional a dicho promotor.

Hasta ahora, la mayoría de sistemas de expresión de gen heterólogo en los sistemas de anfitrión procarióticos se han basado exclusivamente sobre un conjunto limitado de promotores bacterianos. Por consiguiente, también se limita el número de sustratos, que se pueden utilizar como inductores.

Adicionalmente, la producción de un sistema de expresión heteróloga depende del número de anfitriones procarióticos transformados disponibles. Por lo tanto, se requieren sistemas de anfitrión procarióticos que sean capaces de crecer a una alta densidad celular, es decir, permite la proliferación rápida sin perder el vector en la división celular.

El documento US 2007/0259004 A1 describe la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que utiliza un sistema de expresión en Bacillus que comprende un promotor gsiB como un promotor inducible, en donde se puede inducir el promotor por una medida seleccionada de reducción en pH, aumento en la temperatura, adición de alcohol, agotamiento de nutrientes, y limitación de oxígeno.

El documento WO 2004/033633 A2 se relaciona con un vector lanzadera recombinante que comprende un primer origen de replicación o región de integración (OR/RI) funcional en bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC, un segundo OR/RI funcional en un primer tipo bacteriano, un tercer OR/RI funcional en un segundo tipo bacteriano, por lo menos un sitio cos; y por lo menos un marcador de selección de anticuerpo. El vector es inducible a replicación con alto número de copias. El vector es funcional en Bacillus subtilis, B. lichenifomis, B.cereus, B.pumilus, B.anthracis, Glostridium acetobutylicum, Lactobacillus lactis, L.plantarum, o Enterococcus feacalis.

En el documento DE 102 25 380 A1 se describe un plásmido recombinante que comprende:

(a) un vector lanzadera de E. coli y Bacillus, que incluye un sitio de clonación múltiple;

(b) un promotor inducible o constitutivo (P); y

(c) bajo control de P (promotor xylA), un gen glicosiltransferasa.

Los promotores adecuados adicionales son los promotores Bacillus megaterium GlucDH, spolV, bgaM, y el promotor Bacillus subtiles P_{spac}.

En el documento WO 2006/133210 A2 se describe la expresión de polipéptido recombinante en células de Pseudomonas fluorescens en donde la célula se transfecta con ácido nucleico que codifica el polipéptido ligado a un promotor inducible de fuente de carbono seleccionado de promotores inducibles de manitol, glucitol, y arabitol.

Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención estos y otros objetivos serán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se han alcanzado al proporcionar nuevos vectores que comprenden una región promotora del operón de manosa ligados en forma funcional a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es heteróloga a dicho anfitrión, mientras que la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos se controla por dicha región promotora del operón de manosa.

También se proporcionan el uso de dicho nuevo vector para la expresión heteróloga regulada de una secuencia de ácidos nucleicos en un anfitrión procariótico; una secuencia de ácidos nucleicos que se puede expresar aislada y purificada en un anfitrión que comprende una región promotora del operón de manosa; un anfitrión procariótico transformado con dicho vector o dicha secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada; un método para producir un polipéptido en un anfitrión que utiliza dicho vector o dicha secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada; así como también el uso de un anfitrión procariótico transformado con dicho vector o dicha secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada en fermentación, en particular en fermentación de alta densidad celular.

Otros objetivos y ventajas serán evidentes a aquellos expertos en la técnica a partir de la revisión de la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras ilustrativa acompañantes, y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Se muestra en

La Figura 1 la secuencia de ácidos nucleicos de B.subtilis utilizada en el mapeo del sitio de iniciación de transcripción del promotor manP con el sitio de inicio de transcripción en un nucleótido de adenina que se resalta, las secuencias -35 y -10 deducidas en cursiva, el fin de manR y el inicio del gen lys marcado por flechas y los sitios de restricción BglII, XbaI, AflII y NdeI subrayados;

La Figura 2 la secuencia de ácidos nucleicos de la región promotora que comprende promotor manR con el sitio de inicio de transcripción en un nucleótido de guanina que se resalta, las secuencias -35 y -10 deducidas están en cursiva, el inicio del gen manR que se indica por una flecha y el sitio de restricción HinDIII y la secuencia cre putativa que se subraya;

La Figura 3 la secuencia de ácidos nucleicos obtenida de B.subtiles que comprende la región promotora del promotor manR que está contenida en pSUN291, pSUN384.1 y pSUN385.2, respectivamente, con el inicio de lacZ que se indica por una flecha y los sitios de restricción que se subrayan;

La Figura 4 el mapa de plásmido del vector de expresión pSUN 279.2 de acuerdo con la presente invención;

La Figura 5 las actividades de β-galactosidasa de B.subtiles 3NA que contiene los plásmidos pSUN 279.2, pSUN 284.1 y pSUN 291, respectivamente, de acuerdo con la presente invención;

La Figura 6 la secuencia de ácidos nucleicos obtenida de B.subtiles que comprenden la región promotora del promotor manP de B.subtiles que incluye el extremo de terminal C de manR, la región intergénica entre manR y manP, aquí se reemplaza por gen indicador lacZ, con el sitio de inicio de transcripción, las secuencias -35 y -10 que están en negrita, el fin de manR y el inicio de lacZ que se indica por una flecha y los sitios de restricción que se subrayan;

La Figura 7 las actividades de β-galactosidasa de B.subtiles 3NA que contiene el plásmido pSUN 279.2 así como también de plásmidos adicionales que contienen fragmentos de diferentes longitudes de la secuencia de ácidos nucleicos mostrados en la figura 6;

La Figura 8 las actividades de β-galactosidasa de B.subtilis 3NA que comprende los vectores pSUN291, pSUN384.1 y pSUN345.2 con las secuencias de ácidos nucleicos como se muestra en la figura 3;

La Figura 9 el mapa de plásmido del vector de expresión pMW 168.1 de acuerdo con la presente invención;

La Figura 10 un diagrama con el resultado de la prueba de estabilidad de plásmido de pMW 168.1 en B.subtiles 3NA con porción porcentual de células que contienen el plásmido que se grafica sobre el número de generaciones;

La Figuras 11 a 14 diagramas que muestran logarítmicamente la concentración de biomasa seca graficada sobre la duración de las series de fermentación 1 a 4 y diagramas con la señal de fluorescencia (RFU) graficada sobre la duración de fermentación de las series de fermentación 1 a 4; y

Las Figuras 15 y 16 los diagramas de la señal de fluorescencia graficada sobre la duración de fermentación de series de fermentación 5 y 6.

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza aquí, se suministran las siguientes definiciones con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención.

Un “vector que se puede expresar en un anfitrión” o “vector de expresión” es una construcción de ácidos polinucleicos, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido polinucleico específicos que permiten la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos particular en una célula anfitriona. Normalmente, este vector incluye una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos particular que se va a transcribir ligada en forma funcional a un promotor. Un vector que se puede expresar en un anfitrión puede ser por ejemplo un plásmido autónomo o autorreplicante, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus.

Los términos “anfitrión”, “célula anfitriona” y “célula anfitriona recombinante” se utilizan de forma intercambiable aquí para indicar una célula procariótica en la que se han introducido uno o más vectores o secuencias de ácidos nucleicos aisladas y purificadas de la invención. Se entiende que dichos términos se refieren no solo a la célula objetivo particular sino también a la progenie o progenie potencial de dicha una célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido a ya sea mutación o influencias ambientales, dicha progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluyen dentro del alcance del término como se utiliza aquí.

El término “comprende” se utiliza de manera general en el sentido de incluir, es decir se dice que permite la presencia de una o más características o componentes adicionales.

“Promotor” como se utiliza aquí se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que regula la expresión de una unidad transcripcional. Una “región promotora” es una región reguladora capaz de unir la polimerasa ARN en una célula y que inicia la transcripción de un secuencia de codificación hacia 3’ (dirección 3’). Dentro de la región promotora se encontrarán dominios de unión de proteína (secuencias consensus) responsables de la unión de polimerasa ARN tal como la secuencia -35 putativa y la secuencia Pribnow (secuencia -10). Adicionalmente, la región promotora puede comprender el sitio de inicio de transcripción y los sitios de unión para las proteínas reguladoras.

“Operón de manosa” se refiere al operón de manosa de Bacillus subtilis.

Se identifican tres genes en el operón de manosa (Kunst F. N. et al., “The complete genome secuencia of gram-positive bacterium Bacillus subtilis”, Nature 390, páginas 249 a 256 (1997)).

El primer gen, manP, codifica un componente de enzima específico a manosa (transportador) que pertenece a la familia fructosa permeasa. El segundo gen, manA, codifica una isomerasa manosa-6-fosfato mientras que no se conoce la función del tercer gen, yjdF. En dirección 5’ y en la misma orientación de estos tres genes, se encuentra que un gen regulador, manR, codifica ManR, el activador del operón de manosa.

El operón de manosa, que consiste de tres genes manP-manA-yjdF (en lo siguiente denominados en conjunto como “manP”), está bajo el control del promotor manP que a su vez se regula de forma positiva. Otro promotor, promotor manR, es responsable de la expresión de manR es decir fundamental para la inducción dependiente de manosa del promotor manP.

La región promotora manR comprende adicionalmente un sitio de unión de proteína reguladora a catabolito (elementos de respuesta de catabolito (cre)) del gen manR.

La “secuencia Cre” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos ubicada hacia 5’ (dirección 5’) de los genes catabólicos. La secuencia cre une una proteína de control de catabolito (CCP) que previene la expresión del gen catabólico en represión catabólica de carbonos (CCR).

Con “regiones promotoras del operón de manosa” se entiende las regiones promotoras que regulan la expresión de manP así como también de manR con o sin la secuencia cre.

El “promotor manP” como se denomina aquí comprende por lo menos la región -35, la secuencia Pribnow, y el sitio de unión ManR.

El “promotor manR” como se denomina aquí comprende por lo menos la región -35 putativa, la secuencia Pribnow, el sitio de unión ManR y, opcionalmente, una secuencia cre.

D-manosa que también se denomina como “manosa” es un epímero 2 de glucosa y presente en polisacáridos de manano y heteromanano, glicoproteínas y otros numerosos glicoconjugados.

“CcpA” significa “proteína de control de catabolito A” que es una proteína reguladora global y puede activar o represar la activación de algunos operones catabólicos. En el caso del operón de manosa, CcpA cumple una función de represión al unirse a la secuencia cre.

Un “potenciador” es una secuencia de ácidos nucleicos que actúa para potenciar la transcripción de una unidad transcripcional independiente de la identidad de la unidad transcripcional, la posición de la secuencia en relación con la unidad transcripcional, o la orientación de la secuencia. Los vectores de la presente invención opcionalmente pueden incluir potenciadores.

“Unidad transcripcional” como se utiliza aquí se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos es decir transcritos normalmente en una molécula de ARN sencilla. La unidad transcripcional podría contener un gen (monocistrónico) o dos (dicistrónico) o más genes (policistrónico) que codifican de forma funcional las moléculas de polipéptido relacionadas.

Una secuencia de ácidos nucleicos se “liga en forma funcional” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor e ligado en forma funcional a una secuencia de codificación si esta afecta la transcripción de la secuencia; o una región de iniciación de transcripción tal como un sitio de unión de ribosoma se liga en forma funcional a una secuencia de ácidos nucleicos que codifican por ejemplo un polipéptido si se posiciona de tal manera que facilite la traducción del polipéptido. El enlace se puede lograr mediante ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

“Ácido nucleico” o “secuencia de ácidos nucleicos” o “ácido nucleico o secuencia de ácidos nucleicos aislada o purificada” como se denomina en la presente invención podría ser ADN, ARN, o híbrido de ADN/ARN. En el caso en que el ácido nucleico o la secuencia de ácidos nucleicos se ubique sobre un vector es usualmente ADN. El ADN que se menciona aquí puede ser cualquier secuencia de polidesoxinucleótidos, que incluye, por ejemplo ADN de cadena doble, ADN de cadena sencilla, el ADN de cadena doble en donde una o ambas cadenas están compuestas de dos o más fragmentos, el ADN de cadena doble en donde una o ambas cadenas tienen una estructura principal de fosfodiéster ininterrumpida, el ADN que contiene una o más porciones de cadena sencilla y una o más porciones de cadena doble ADN de cadena doble en donde las cadenas de ADN son completamente complementarias, el ADN de cadena doble en donde las cadenas de ADN son solo parcialmente complementarias, ADN circular, ADN cerrado de forma covalente, ADN lineal, ADN entrecruzado de forma covalente, cADN, ADN sintetizado por químicos, ADN semisintético, ADN biosintético, ADN aislado en forma natural, ADN digerido por enzima, ADN fragmentado, ADN marcado, tal como ADN radiomarcado y ADN marcado con fluorocromo, ADN que contiene una o más especies o ácidos nucleicos de origen no natural. Las secuencias de ADN se pueden sintetizar mediante técnicas químicas estándar, por ejemplo, el método fosfotriéster o a través de métodos sintéticos automatizados y métodos PCR. La secuencia de ADN asilada y purificada también se puede producir mediante técnicas enzimáticas.

El ARN que se menciona aquí puede ser por ejemplo ARN de cadena sencilla, cARN, ARN de cadena doble, ARN de cadena doble en donde una o ambas cadenas están compuestas de dos o más fragmentos, ARN de cadena doble en donde una o ambas cadenas tienen una estructura principal de fosfodiéster ininterrumpida, ARN que contiene una o más porciones de cadena sencilla y una o más porciones de cadena doble, ARN de cadena doble en donde las cadenas de ARN son completamente complementarias, ARN de cadena doble en donde las cadenas de ARN son solo parcialmente complementarias, ARN entrecruzado de forma covalente, ARN digerido por enzima, ARN fragmentado, mARN, ARN sintetizado químicamente, ARN semisintético, ARN biosintético, ARN aislado en forma natural, ARN marcado, tal como ARN radiomarcado y marcado con flourocromo ARN, ARN que contiene una o más especies de ácidos nucleicos de origen no natural.

Con “variantes” o “variantes de una secuencia” se entiende una secuencia de ácidos nucleicos que varía de la secuencia de referencia mediante sustituciones de ácido nucleico conservadoras, por lo cual uno o más ácidos nucleicos se sustituyen por otro con mismas características. Las variantes abarcan también secuencias degeneradas, secuencias con eliminaciones e inserciones, siempre y cuando dichas secuencias modificadas exhiban la misma función (funcionalmente equivalente) como la secuencia de referencia.

Como se utiliza aquí, los términos “polipéptido”, “péptido”, “proteína”, “polipeptídico” y “peptídico” se utilizan de forma intercambiable para designar una serie de residuos de aminoácidos entre sí mediante enlaces de péptido entre los grupos alfa- amino y carboxi de residuos adyacentes.

El término “secuencia de ácidos nucleicos purificada y aislada” se refiere al estado en el que la secuencia de ácidos nucleicos estará de acuerdo con la presente invención. La secuencia de ácidos nucleicos estará libre o sustancialmente libre del material con el cual se asocia naturalmente tal como otros ácidos nucleicos con los cuales se encuentran en su ambiente natural, o el ambiente en el que se preparan (por ejemplo cultivo celular) cuando dicha preparación es mediante tecnología recombinante practicada in vitro o in vivo.

Los términos “transformación”, “transformado” o “introducir un ácido nucleico en una célula anfitriona” denotan cualquier proceso en donde un ácido nucleico extracelular como un vector, con o sin el material acompañante, ingresa a una célula anfitriona. El término “células transformadas” o “célula transformada” significa la célula o su

progenie en la que se ha introducido el ácido nucleico extracelular y por lo tanto aloja ácido nucleico extracelular. El ácido nucleico se podría introducir en la célula de tal manera que el ácido nucleico es replicable ya sea como un integrante cromosómico o como un elemento cromosómico extra. La transformación de células anfitrionas apropiadas con por ejemplo un vector de expresión se puede lograr mediante métodos bien conocidos tales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas o mediante métodos químicos tales como transformación mediada con fosfato de calcio, descritos por ejemplo en Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory o in Ausubel et al. 1994, Current protocols in molecular biology, John Wiley y Sons.

La “secuencia de ácidos nucleicos heteróloga” o “secuencia de ácidos nucleicos heteróloga a un anfitrión” significa una secuencia de ácidos nucleicos que codifica por ejemplo un producto de expresión tal como un polipéptido es decir externo al anfitrión (“expresión heteróloga” o “producto heterólogo”) es decir una secuencia de ácidos nucleicos que se originan a partir de un donante diferente del anfitrión o una secuencia de ácidos nucleicos químicamente sintetizada que codifica por ejemplo un producto de expresión tal como un polipéptido es decir externo al anfitrión. En caso en que el anfitrión sea una especie procariótica particular, la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga se origina preferiblemente a partir de un género o familia diferente, se prefiere más de un orden o clase diferente, en particular de un phylum diferente (división) y más particularmente desde un dominio diferente (“empire”) de organismos.

La secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que se origina a partir de un donante diferente del anfitrión se puede modificar, antes de ser introducida en una célula anfitriona, mediante mutaciones, inserciones, eliminaciones o sustituciones o ácidos nucleicos sencillos o una parte de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga siempre que dichas secuencias modificadas exhiban la misma función (funcionalmente equivalente) como la secuencia de referencia. Una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga como se menciona aquí abarca también secuencias nucleicas que se originan a partir de un dominio diferente (“empire”) de organismos tales como a partir de eucariotas (de origen eucariótico) tales como por ejemplo anticuerpos humanos que se han utilizado en colecciones de exhibición de fagos y de los cuales se han modificado los ácidos nucleicos sencillos o una parte de las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con el “uso de codón” de un anfitrión procariótico.

Dentro del significado de la presente invención el término “secuencia de ácidos nucleicos heteróloga” o “secuencia de ácidos nucleicos heteróloga a un anfitrión” también abarca una secuencia de ácidos nucleicos que se deriva del anfitrión y codifica un polipéptido, expresado naturalmente en ese anfitrión, en donde la secuencia de ácidos nucleicos se inserta en un vector de la presente invención y bajo el control de la región promotora de operón de manosa de la presente invención.

“Región de iniciación de transcripción” es una región de señal que promueve la iniciación de transcripción y que comprende la secuencia para el sitio de unión de ribosoma tal como la secuencia Shine Dalgarno.

Normalmente la región de iniciación de transcripción se ubica en dirección 3’ al sitio de iniciación de transcripción y se liga en forma funcional a los genes que se van a expresar.

“Región de terminación de transcripción” se refiere a una secuencia que origina polimerasa ARN para terminar la transcripción. La región de terminación de transcripción es usualmente parte de una unidad transcripcional que puede evitar la transcripción no deseada de otros genes cercanos o la transcripción forma otros promotores potenciales y puede incrementar la estabilidad del mARN.

“Anticuerpo” se refiere a una clase de proteínas de plasma producidas por las células del sistema inmune después de estimulación mediante un antígeno. Los anticuerpos de mamífero (es decir Humano) son inmunoglobulinas de la clase Ig G, M, A, E o D. El término “anticuerpo” como se utiliza para propósitos de esta invención incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos anti-idiotípicos y anticuerpos aut presentes en enfermedades autoinmunes, tales como diabetes, esclerosis múltiples y artritis reumatoide así como también anticuerpos quiméricos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un vector que se puede expresar en un anfitrión que comprende una región promotora del operón de manosa ligado en forma funcional a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es heteróloga a ese anfitrión, mientras que la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos se controla por dicha región promotora del operón de manosa.

El vector de acuerdo con la invención es preferiblemente una plásmido autónomo o de autorreplicación, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de anfitrión/vector en las expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de esta invención.

Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir de segmentos de secuencias de ácidos nucleicos cromosómicas, no cromosómicas y/o sintéticas.

Los vectores adecuados incluyen vectores con rango de anfitrión específico tal como vectores específicos para por ejemplo B.subtilis y E.coli, respectivamente así como también vectores con rango de anfitrión amplio tal como vectores útiles para bacterias gram positivas y bacterias gram negativas.

Se pueden utilizar plásmidos de “de bajo número de copias”, “de medio número de copias” así como también “alto número de copias”.

Por ejemplo, en Bacillus subtilis un plásmido de bajo número de copias es pAMbeta1, plásmidos de medio número de copias son derivados de pBS72 y un plásmido de alto número de copias es pUB110.

De acuerdo con la presente invención la región promotora del operón de manosa comprende la región promotora manR y la región promotora manP, respectivamente.

La secuencia de ácidos nucleicos de B.subtilis que abarca el extremo de terminal C de manR, la región intergénica entre manR y manP, seguida por el gen lisostafina lys como gen indicador, se proporciona en al figura 1.

La secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención que comprende la región promotora de manP preferiblemente comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la figura 1 desde bp -80 hasta el codón de inicio de lys (SEQ ID NO.1) y más preferiblemente la secuencia de ácidos nucleicos de la figura 1 desde bp -80 e inclusive bp -1, es decir en dirección 5’ del sitio de iniciación de transcripción A a bp+1 (SEQ ID No.2).

La secuencia de ácidos nucleicos de B.subtiles que abarca la región promotora de manR, el sitio de iniciación de transcripción G a bp+1, una secuencia cre putativa, la región de iniciación de transcripción entre bp+1 y manR, así como también parte de manR, se proporciona en la figura 2 y en la figura 3, en donde manR se reemplaza por lacZ. La secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención que comprende la región promotora de manR preferiblemente comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la figura 3 desde bp -122 hasta el codón de inicio de lacZ (SEQ ID NO.3), más preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos de la figura 3 desde bp -122 y bp +7, es decir inclusive la secuencia cre putativa, (SEQ ID NO.4), y, en particular, la secuencia de ácidos nucleicos de la figura 3 desde bp -122 y bp-1, es decir en dirección 5’ del sitio de iniciación de transcripción G a pb+1 (SEQ ID NO.5).

Ambas regiones promotoras de manP y manR comprenden sitios de unión para ManR.

La presente invención también abarca una secuencia complementaria para cualquiera de las SEQ ID NOs.1-5 y variantes de las mismas.

Las regiones promotoras del operón de manosa, tal como la región promotora manP, la región promotora manR (con o sin secuencia cre) así como también las regiones promotoras de acuerdo con las secuencias SEQ ID NOs. 1-5, una secuencia complementaria de las mismas o variantes de las mismas utilizadas en la presente invención son usualmente del operón de manosa de B.subtilis o de una región promotora equivalente funcional de otros organismos procarióticos, en particular de organismos de la familia de bacilaceae. Una región promotora equivalente funcional de otros organismos procarióticos abarca una región promotora que es inducible por D-manosa, es decir una región promotora que tiene una mayor actividad de expresión en la presencia de en la ausencia de manosa.

En muchos organismos procarióticos tales como Firmicutes como B.subtilis, el operón de manosa está implicado en el metabolismo de D-manosa.

El B.subtilis puede utilizar muchos azúcares diferentes como fuente de carbono. Las hexosas tales como glucosa y D-manosa se toman principalmente a través del sistema fosfotransferasa (PTS) para fosfoenolpiruvato: carbohidrato. En el PTS, la hexosa respectiva se fosforila y transporta de manera simultánea en la célula durante la absorción. La absorción y utilización de un sustrato de azúcar específico se somete a represión catabólica por carbono (CCR). En la presencia de glucosa, se represa el sustrato de azúcar preferido de B.subtilis, la transcripción de los genes para absorción y la utilización de otros sustratos tales como el operón de manosa.

El mecanismo de la glucosa dependiente de CCR en B.subtilis se ha estudiado ampliamente y se conoce en la técnica (Stülke J. et al., “Regulation of carbon catabolism in Bacillus species”, en Annu. Rev. Microbiol. 54, 2000, páginas 849-880)

La unidad transcripcional de acuerdo con la presente invención usualmente comprende adicionalmente una región de iniciación de traducción en dirección 5’ del punto de iniciación (codón de inicio) de la traducción de dicha unidad transcripcional, mientras que la región de iniciación de traducción se liga en forma funcional a la secuencia de ácidos nucleicos. La región de iniciación de traducción se ubica usualmente en dirección 5’ directamente adyacente al punto de iniciación de la traducción de la unidad transcripcional que puede ser ATG, GTG o TTG.

La región de iniciación de traducción puede ser la región de iniciación de traducción de la unidad transcripcional del gen manP o gen manR en el operón de manosa.

La región de iniciación de traducción del gen manP o manP del operón de manosa se puede reemplazar total o parcialmente por otra región de iniciación de traducción.

Por ejemplo, se pueden utilizar las regiones de iniciación de traducción de tufA (factor de elongación Tu) y gsiB (proteína de estrés; Jürgen et al., 1998, Mol. Gen. Genet. 258, 538-545) ambas de B.subtilies.

Las secuencias de ácidos nucleicos respectivas de tufA y gsiB se muestran adelante con el codón de inicio en negrita, los sitios de restricción subrayados y la Secuencia Shine-Dalgarno resaltada.

tufA:

5'- cttaagGAGGATTTTAGA**ATG**GCTAAAGAAAAATTCggatcc -3'

*Afl*II SD Codón de inicio *Bam*HI

gsiB:

5'- cttaagAATTAAAGGAGGAATTCAAA**ATG**GCAGACAATAACAAAggatcc -3'

*Afl*II SD Codón de inicio *Bam*HI

Mediante la selección adecuada de la región de iniciación de transcripción se puede mejorar la estabilidad del mARN, que es un rasgo importante en la expresión de gen. La estabilidad del mARN se caracteriza por su vida media específica.

Además de la región de iniciación de transcripción también se puede reemplazar el punto de iniciación de la traducción así como también, opcionalmente, un número de los codones del gen siguiendo el punto de iniciación, por ejemplo aproximadamente 5-6 codones, por ejemplo como se muestra anteriormente en las secuencias de ácidos nucleicos de tufA y gsiB, respectivamente.

La región de iniciación de traducción puede comprender adicionalmente una secuencia que codifica la secuencia de señal ligada en forma funcional a la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga de la invención. La secuencia de señal se ubica usualmente en dirección 3' directamente adyacente al punto de iniciación de la traducción, que puede ser ATG, GTG o TTG de la unidad transcripcional.

En caso que se utilice una unidad transcripcional dicistrónica o policistrónica, se puede aplicar secuencias de señal ligadas diferentes o idénticas en forma funcional a cada uno de las cistrones.

Preferiblemente se utilizan secuencias de señal diferentes en dicho caso. La secuencia de señal utilizada puede ser una secuencia de señal procariótica o eucariótica. Usualmente se aplican secuencias de señal procarióticas.

Las secuencias de ADN que codifican secuencias de señal que se van a emplear en los vectores de expresión de la presente invención se pueden obtener comercialmente o sintetizar químicamente. Por ejemplo, las secuencias de señal se pueden sintetizar de acuerdo con el método de triméster de fosforamidita de fase sólida descrito en Beaucage & Caruthers, 1981, Tetrahedron LeHs. 22, 1859-1862 as described in Van Devanter et. Al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984). Purification of oligonucleótidos can be performed by either native acrylamide gel electrophoresis or by anion-exchange HPLC as described in Pearson & Reanier, J. Chrom. 255:137-149 (1983).

Usualmente la unidad transcripcional comprende adicionalmente una región de terminación de transcripción.

Preferiblemente se utiliza regiones de terminación de transcripción fuertes para evitar "lectura a través de" por el promotor de la unidad de transcripción en la secuencia de plásmido de flanqueo así como también de otros promotores de plásmido en la unidad de transcripción. Adicionalmente, se observa la estabilización del mARN en la presencia de dicha región de terminación de transcripción.

Un ejemplo adecuado de una región de terminación de transcripción fuerte tiene la secuencia de ácidos nucleicos 5'-CGAGACCCCTGTGGGTCTCG- 3' de la 3'-región de tufA de B.subtilis 168 que está disponible comercialmente.

La secuencia de ácidos nucleicos heteróloga de acuerdo con la presente invención codifica un producto de expresión es decir externo al anfitrión. En caso que el anfitrión sea una especie procariótica tal como B.subtilis o E.coli la secuencia de ácidos nucleicos de interés es más preferiblemente de otra clase como la gammaproteobacterias tal como de por ejemplo Burkholderia sp., en particular de un phylum diferente tal como arqueo bacterias, más particular de un organismo eucariótico tal como mamíferos en particular de humanos. Sin embargo, la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga podría ser modificada de acuerdo con el "uso de codón" del anfitrión. La secuencia heteróloga de acuerdo con la presente invención es usualmente un gen de interés. El gen de interés preferiblemente encierra un polipéptido heterólogo tal como una proteína estructural, reguladora o terapéutica, o fusiones de terminal N o C de proteínas estructurales, reguladoras o terapéuticas con otras proteínas ("Tags") tal como proteína fluorescente verde u otras proteínas de fusiones. La secuencia de ácidos nucleicos heteróloga podría codificar también un transcrito que se puede utilizar en la forma de ARN, tal como por ejemplo ARN antisentido.

Se puede producir la proteína como un agregado insoluble o como una proteína soluble que está presente en el citoplasma o en el espacio periplásmico de la célula anfitriona, y/o en el medio extracelular. Preferiblemente, la proteína se produce como una proteína soluble que está presente en el espacio periplásmico de la célula anfitriona y/o en el medio extracelular.

La proteína heteróloga de interés puede ser de humano, mamífero o de origen procariótico. Otras proteínas son antígenos, tales como glicoproteínas y carbohidratos de de patógenos microbianos, víricos y antibacterianos, y de tumores. Otras proteínas son enzimas como quimosina, proteasas, polimerasas,deshidrogenasas, nucleasas, glucanasas, oxidasas, alfa-amilasa, oxidorreductasas, lipasas, amidasas, nitril hidratasas, esterasas o nitrilasas.

En la presente invención se pueden variar el orden y la distancia en la que se disponen la secuencia de señal y las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas dentro de los dentro de los vectores de expresión. En realizaciones preferidas la secuencia de señal es 5' (en dirección 5') a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica por ejemplo el polipéptido de interés. La secuencia de señal y la secuencia de ácidos nucleicos codifica por ejemplo el polipéptido de interés que se puede separar por cero a aproximadamente 1000 aminoácidos. En realizaciones preferidas, la secuencia de señal y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica por ejemplo el polipéptido de interés están directamente adyacentes entre sí, es decir separados por cero ácidos nucleicos.

Preferiblemente, el vector de la presente invención comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las secuencias SEQ ID NOs 1-5, una secuencia complementaria de las mismas y variantes de estas.

También se abarcado por la presente invención está el uso de un vector de acuerdo con la invención para la expresión heteróloga regulada de una secuencia de ácidos nucleicos en un anfitrión procariótico.

La expresión se inicia por la adición de un inductor adecuado. El inductor del operón de manosa es manosa o un derivado de la misma capaz de inducir la región promotora manR región promotora o manP del operón de manosa. La expresión se puede regular mediante la cantidad de inductor disponible para el anfitrión procariótico.

En todavía un otro aspecto la invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada que comprende una región promotora del operón de manosa. Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada comprende el promotor manP y/o el promotor manR del operón de manosa. Más preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada comprende cualquiera de la SEQ ID NOs 1 a 5. La secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada que comprende una región promotora del operón de manosa se puede ligar en forma funcional a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, en donde la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido está bajo el control de la región promotora del operón de manosa.

La secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada de acuerdo con la presente invención puede comprender la secuencia completa o parcial o una secuencia parcial del gen regulador manR.

Por lo menos la secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada del promotor manR puede comprender una secuencia cre.

La secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada de esta invención se puede aislar de acuerdo con protocolos PCR estándar y métodos conocidos en la técnica. La secuencia de ADN asilada y purificada puede comprender adicionalmente una o más secuencia reguladoras, como se conocen en la técnica, por ejemplo un potenciador, usualmente empleado para la expresión del producto codificado por la secuencia de ácidos nucleicos.

Con el fin de seleccionar células anfitrionas transformadas de exitosa y establemente con el vector o la secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada de la presente invención, se puede introducir un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo resistencia a antibióticos) en las células anfitrionas junto con la secuencia de ácidos nucleicos de interés. El gen que codifica un marcador seleccionable se podría ubicar sobre el vector o sobre la secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada o se podría opcionalmente cointroducir en una forma separada, por ejemplo sobre un vector separado. Se pueden utilizar diversos marcadores seleccionables que incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos, tales como espectinomicina, higromicina, ampicilina y tetraciclina. La cantidad del antibiótico se puede adaptar según se desee con el fin de crear condiciones selectivas. Usualmente se utiliza un marcador seleccionable.

En el caso en que el vector sea un vector lanzadera se puede seleccionar un marcador común para los anfitriones adecuados. Por ejemplo, en el caso en el que vector sea un vector lanzadera replicable en E.coli y B.subtilis se puede utilizar el gen marcador de resistencia que codifica la espectinomicina-adeniltransferasa de Enterococcus faecalis que confiere resistencia a espectinomicina.

También se pueden introducir genes indicadores tales como proteínas fluorescentes en las células anfitrionas junto con la secuencia de ácidos nucleicos de interés, con el fin de determinar la eficiencia de la transformación.

Los genes indicadores adecuados son, por ejemplo, aquellos que codifican las proteínas fluorescentes verdes mejoradas (eGFP) y lacZ que codifica β-galactosidasa. Ambos genes indicadores están disponibles comercialmente y son ampliamente utilizados.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un anfitrión procariótico transformado con un vector de la presente invención en donde el vector comprende una región promotora del operón de manosa. Preferiblemente el

vector comprende cualquiera de la SEQ ID NOs 1 a 5, una secuencia complementaria de las mismas o variantes de estas.

Una amplia variedad de células anfitrionas procarióticas son útiles para que sean transformadas con un promotor inducible por la región manosa del operón de manosa de acuerdo con la presente invención. Estos anfitriones pueden incluir cepas de células Gram-positivas tales como Bacillus y Streptomyces, o células Gram-negativas tales como E.coli y Pseudomonas. Preferiblemente, la célula anfitriona es una célula Gram-positiva, en particular del phylum Firmicutes, más preferiblemente la célula anfitriona es Bacillus.

Los Bacillus que se pueden utilizar son por ejemplo las cepas B.subtilis, B.amyloliquefaciens, B.licheniformis, B.natto, B.megaterium, etc. preferiblemente, la célula anfitriona es B.subtilis, tal como B.subtilis 3NA y B.subtilis 168.

Las E.coli que se pueden utilizar son por ejemplo las cepas TG1, W3110, DH1, XL1-Blue y Origami, que están disponibles comercialmente.

Las células anfitrionas adecuadas están comercialmente disponibles, por ejemplo, a partir de colecciones de cultivos tales como el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

Por ejemplo, el Bacillus se puede obtener a partir del Bacillus Genetik Stock Center.

La célula anfitriona podría o no podría metabolizar la manosa. Una célula anfitriona que es normalmente capaz de absorción y metaboliza la manosa como el B.subtilis se podría modificar para que sea deficiente en una o más funciones relacionadas con la absorción y/o metabolismo de manosa. La deficiencia en una o más funciones relacionadas con la absorción y/o metabolismo de manosa se puede alcanzar por ejemplo al suprimir o bloquear la expresión de un gen que codifica una proteína tal como el gen manA que codifica manosa-6-fosfat-isomerasa. Esto se puede realizar mediante técnicas conocidas tales como mutación soportada por transposón o mutación inactivada.

Usualmente, el anfitrión procariótico corresponde a las secuencias de señal escogidas, por ejemplo se utilizan en caso de secuencias de señal de Bacillus, la célula anfitriona es usualmente un miembro de la misma familia de la bacilaceae, más preferiblemente la célula anfitrionaes una cepa de Bacillus strain.

Preferiblemente se utiliza un anfitrión que posee un sistema de fosfotransferasa (PTS) para fosfoenolpiruvato: carbohidrato. En particular, el anfitrión que posee un sistema PTS es un microorganismo del orden Bacillales, en particular del género Bacillus y más preferiblemente de la especie Bacillus subtilis o un microorganismo del orden Enterobacteriales, preferiblemente del género Escherichia y más preferiblemente de la especie E.coli.

El elemento primario de CCR es la proteína de control de catabolito A (CcpA), que es capaz de unir a la secuencia cre, tal como la secuencia cre putativa en la SEQ ID NOs 3 y 4. En el estado unido de transcripción CcpA del gen respectivo, se represa aquí manR.

En la ausencia de glucosa y en la presencia de un inductor tal como D-manosa, no existe represión por la unicón de CcpA y la transcripción de los genes del operón de manosase inicia al unir la proteína reguladora (ManR) a los sitios de unión respectivos de las regiones promotoras del operón de manosa. De forma sorprendente los presentes inventores han encontrado que la ManR no es solo la proteína reguladora para la región promotora manP sino un autorregulador para manR en sí mismo.

Se proporciona adicionalmente con la presente invención un método para producir un polipéptido en una célula anfitriona, que comprende las etapas de

a) construir un vector,

b) transformar un anfitrión procariótico con dicho vector,

c) permitir la expresión de dicho polipéptido en un sistema de cultivo celular bajo condiciones adecuadas,

d) recuperar dicho polipéptido desde el sistema de cultivo celular.

El vector utilizado, así como también su construcción y la transformación de un anfitrión procariótico son como se definió anteriormente, mientras que la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está comprendida por el vector codifica un polipéptido.

Se puede aplicar como sistema de cultivo celular continuo o cultivo discontinuo tal como cultivo en tanda o cultivo de tanda de carga en tubos de cultivo, matraces de agitación o fermentadores bacterianos.

Para cultivar las células anfitrionas se pueden utilizar medios convencionales como aquellos conocidos en la técnica tales como medios complejos similares a “medio de caldo de levadura nutriente”, un medio que contiene glicerol como se describe por Kortz et al. 1995, J. Biotechnol. 39, 59-65, unos medios de sal mineral como se describe por Kulla et al., 1983, Arch. Microbiol, 135, 1, un medio de tanda para fermentación de E.coli como se describe por

Wilms et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 73, 95-103 o medio LB como se describe por Bertram et al, 1051, J. Bacteriol. 62, 293-300.

El medio comprende una fuente de carbono adecuada, por ejemplo como azúcar tal como glucosa, como un sustrato para que crezca la célula anfitriona. La fuente de carbono utilizada es diferente del inductor.

El medio se podría modificar según sea adecuado, por ejemplo al agregar ingredientes adicionales tales como reguladores, sales, vitaminas, aminoácidos, antibióticos u otros micronutrientes como se conoce de manera general por aquellos expertos en la técnica.

También se pueden utilizar diferentes medios o combinaciones de medios durante el cultivo de las células.

Preferiblemente, el medio utilizado como medio básico no debe incluir el inductor, con el fin de alcanzar una regulación estrecha del promotor de regiones de manosa.

Además se puede iniciar el inductor después que el cultivo alcanza un parámetro de determinación. Ejemplos de dichos parámetros de determinación son la densidad óptica (OD) que indica la concentración celular del cultivo, o concentración de fuente de carbono, que es diferente del inductor.

Por ejemplo, en el actual proceso se puede agregar el inductor después que el cultivo alcanza la OD apropiada dependiendo del sistema de cultivo. Para los cultivos en tanda en frascos de agitación un OD600 típico como parámetro de determinación es aproximadamente 0.3 o más.

Usualmente, la cantidad de inductor, tal como manosa, en el medio del cultivo de anfitrión procariótico se ajusta para que sea aproximadamente 10 g/l, preferiblemente aproximadamente 5 g/l, más preferiblemente aproximadamente 2 g/l.

Sin embargo, la cantidad de inductor agregada se puede adaptar a los requerimientos del proceso de fermentación.

El modo de adición de inductor (régimen de inducción) se puede seleccionar de acuerdo con el sistema de cultivo específico.

Se pueden regular adicionalmente mediante el modo de índice de crecimiento por adición e índice de expresión de las células anfitrionas.

Por ejemplo, se puede manosa de forma discontinua o continua durante periodos de tiempo adecuados. En el modo de adición discontinua (inducción por impacto) puede ser una vez solo en el punto de inducción, o dos veces o aún varias veces en intervalos adecuados. El modo adecuado depende del sistema de cultivo y se puede ser determinado fácilmente por aquellos expertos en la técnica.

Por ejemplo, se le modo continuo, se puede agregar manosa en un índice constante o índice de reducción/aumento.

La adición continua puede estar adicionalmente dentro de un intervalo de tiempo seleccionado del cultivo, por ejemplo intervalo de tiempo seleccionado durante el crecimiento exponencial del cultivo. Adicionalmente, es posible una combinación de régimen de inducción discontinua y continua.

Los rangos de pH apropiados son, por ejemplo, 6-8 preferiblemente 7-7.5, las temperaturas de cultivo apropiadas están entre 10 y 40° C, preferiblemente entre 20 y 37° C.

Se incuban las células usualmente siempre que se tome hasta la cantidad máxima del producto expresado y/o biomasa que se ha acumulado, preferiblemente entre 1 hora y 20 días, más preferiblemente entre 5 horas y 3 días.

Como la producción de biomasa la cantidad de producto expresado depende del sistema de cultivo utilizado.

En el cultivo de matraz de agitación se puede producir el producto usualmente expresado en la cantidad de 0.5 g/l de medio de cultivo con un anfitrión transformado con un vector de la presente invención. Utilizando un cultivo de fermentador en modo de tanda y/o tanda de carga se puede obtener un producto expresado en la cantidad de usualmente más de 0.5 g/l de caldo de fermentación, preferiblemente más de 1 g/l, más preferiblemente más de 1.3 g/l.

Adicionalmente, en el proceso fermentación de esa presente invención utilizando las células anfitrionas de la presente invención se pueden obtener altas densidades celulares desde hasta 10 a 30 OD_{600}, en particular por lo menos 50 OD_{600} hasta aproximadamente 500 OD_{600} que califican el proceso de fermentación de la presente invención para una fermentación de alta densidad celular. En particular, en un proceso de tanda de carga de acuerdo con la presente invención se pueden obtener densidades celulares de más de 50 OD_{600} y hasta 500 OD_{600}.

Más aún, las células anfitrionas de acuerdo con la presente invención permiten un alto índice de duplicación sin pérdida del vector.

Luego de la expresión en la célula anfitriona, el producto expresado tal como un polipéptido de interés luego se puede recuperar a partir del cultivo de células anfitrionas. Con el fin de obtener un rendimiento máximo del producto expresado las células usualmente se cosechan al final del cultivo y se someten a lisis, tal como lisis mediante tratamiento con lisozima, sonicación o Prensa French. Así, los polipéptidos usualmente se obtienen primero como lisado crudo de las células anfitrionas. Luego se pueden purificar mediante procedimientos de purificación de proteína estándar conocidos en la técnica que pueden incluir precipitación diferencial, cromatografía de tamaño molecular, cromatografía de intercambio iónico, enfoque isoeléctrico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, e inmunoafinidad. Estos métodos practicados de forma habitual bien conocidos se describen en, por ejemplo Ausubel et al., supra., y Wu et al. (eds.), Academic Press Inc., N.Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology. Por ejemplo, para purificación de inmunoglobulinas producidas recombinantemente, ellas se pueden purificar con cromatografía de inmunoafinidad mediante paso a través de una columna que contiene una resina que ha unido a las mismas moléculas objetivo a las que se pueden unir específicamente las inmunoglobulinas expresadas.

La presente invención también se relaciona con métodos y medios para la expresión intracelular heteróloga de ácidos nucleicos que codifican por ejemplo el polipéptido en un anfitrión procariótico. En particular la presente invención se relaciona con vectores y el uso de dichos vectores para la expresión intracelular de un polipéptido heterólogo en un anfitrión procariótico utilizando el vector de la presente invención.

En la expresión intracelular el polipéptido se expresa dentro del citoplasma y no se transporta desde el citoplasma a ubicaciones no citoplasmáticas. El polipéptido se expresará dentro del citoplasma en una forma de cuerpos de inclusión o en forma soluble. También son bien conocidos, los procedimientos para aislar y purificar polipéptidos a partir de la célula, en particular del extracto celular.

Los promotores de manosa de la presente invención son ventajosos en que pueden ser estrictamente regulados, inducidos mediante un compuesto común y no tóxico y por lo tanto industrialmente útil.

Adicionalmente, los promotores de manosa de la presente invención así como también vectores que comprenden dichos promotores de manosa son estables dentro de las células y no se pierden incluso después de una pluralidad de duplicaciones de células. Así, es posible la fermentación a alta densidad celular con las células anfitrionas transformadas de acuerdo con la presente invención.

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes de aquellas descritas específicamente. Se entiende que la invención incluye dichas variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu o características esenciales de la misma. La invención también incluye todas las etapas, rasgos, composiciones y compuestos mencionados para o indicados en esta especificación, individualmente o colectivamente, y todas y cualesquier combinaciones o cualquiera de dos o más de dichas etapas o rasgos. Por lo tanto la presente descripción se considera como en todos los aspectos ilustrativa y no restrictiva, el alcance de la invención se indica por las reivindicaciones adjuntas, y todos los cambios que caen dentro del significado y rango de equivalencia están destinados a ser abarcados aquí.

La anterior descripción se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Dichos ejemplos son sin embargo ejemplos de métodos de para practicar la presente invención y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

I) Aislamiento e identificación de regiones promotoras del promotor manR y el promotor manP de operón de manosa

Si no se establece lo contrario se han utilizado los siguientes materiales y métodos:

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

E. coli JM109 (Yanisch-Perron C. et al., Gene 33, 1985, 103-119) y Bacillus subtilis 3NA (Michel J. F. et al., J. Appl. Bacteriol. 33, 1970, 220-227) se utilizan como anfitriones principales para clonación y expresión. Se hace crecer E. coli en medio líquido LB (Luria S. E. et al., Virology 12, 1960, 348-390) y placas de agar LB complementadas con 100 µg ml^{-} de ampicilina o espectinomicina a 37° C. Se hacer crecer B. subtilis en medio líquido LB y medio mínimo C o S a 37° C (Martin-Verstraete I. et al., J. Mol.Biol. 214, 1990, 657-671). El medio líquido y las placas de agar se complementan con 100 µg ml^{-1} de espectinomicina, 10 µg ml^{-1} de kanamicina o 5 µg ml^{-1} de eritromicina, respectivamente. Para inducción del promotor de manosa, se agrega D-manosa filtrada estéril o esterilizada en autoclave a una concentración final de 0.2 %.

Materiales

Se obtienen todos los productos químicos de Sigma-Aldrich (Taufkrichen, Alemania), Fluka (Buchs, Alemania) o Merck (Darmstadt, Alemania). Los oligonucleótidos de ADN sintéticos se compran de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania). Las enzimas de restricción y enzimas que modifican el ADN se compran de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania) o New Engly Biolabs. (Frankfurt am Main, Alemania). Los PCR se corren con polimerasa de ADN de Alta Fidelidad de Fermentas (ST. Leon-Rot, Alemania) sobre un MiniCiclador de Biozym

Preparación de ADN y transformación

Se lleva a cabo aislamiento de ADN a partir de E.coli y B.subtilis o de gel de agarosa con equipos de preparación de ADN de Qiagen (Hilden, Alemania) o Roche (Mannheim, Alemania) como se describe por el fabricante. Se utilizan técnicas moleculares estándar a través de los ejemplos.

E.coli se transforma con ADN de plásmido como se describe por Chung C.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, 2172-2175. B.subtilis se transforma con ADN de plásmido de acuerdo con el "método de Paris" modificado (Harwood C.R. Molecular Biological Methods for Bacillus, 1990, John Wiley & Sons Ltd., Engly).

Medición de la actividad de B-galactosidasa

1 ml de las células que se van a examinar se tratan con 10 ml de tolueno durante 30 min a 37° C. La actividad de β-galactosidasa se determina con o-nitrofenil-β-galactopiranosida a 22° C de acuerdo con el método de Millar (Miller J. H., 1972, experimentos in molecular genetics, Cold Spring Harbor, NY).

Oligonucleótidos utilizados

Tabla 1.

Oligonucleótido	Secuencia	Propósito
s4693	5'-AAA AAA ACG CGT GTT TAA ACT GAA TTT CTG CTG AAT ATA CA-3'	Amplificación PCR de manR a partir de B. subtilis
s4694	5'-AAA AAA TCT AGA AAG TGT GAA TAA TAA GAT CTT G-3'	Amplificación PCR de manR a partir de B. subtilis
s4802	5'-AAA AAA ACT AGT GTT TAA ACA GGG AAA AAT GCC TTT ATT AC-3'	Cebador delantero para amplificación de $P_{manP\Delta 3}$
s4833	5'-AAA AAA GTT TAA ACC CCT GGC GAA TGG CGA T-3'	Amplificación de spc a partir de plásmido pDG1730
s4835	5'-AAA AAA GAA TTC ATT AGA ATG AAT ATT TCC CAA AT-3'	Amplificación de spc a partir de plásmido pDG1730
s4956	5'-AAT TGC GTC GAG ACC CCT GTG GGT CTC GTT TTT TGG ATC CGG CGC CCA CGT GGC TAG CC-3'	Inserción de terminador tufA
s4957	5'-TTA AGG CTA GCC ACG TGG GCG CCG GAT CCA AAA AAC GAG ACC CAC AGG GGT CTC GAC GC-3'	Inserción de terminador tufA
s5006	5'-Cy5-TAG CCT TTT TTA TAG TTG TTC AGC CAC TGT-3'	Cebador marcado para extensión de cebador
s5007	5'-Cy5-ATC CAC GCC ATA ATG CAT GCC GCC ATT AAT-3'	Cebador marcado para extensión de cebador
s5097	5'-Cy5-CACTGTACCCTATCTGCGAAA-3'	Cebador marcado para extensión de cebador
s5098	5'-Cy5-ATTGAGATAATCCTCGATCACTT-3'	Cebador marcado para extensión de cebador
s5203	5'-GATATCCTGCACCATCGTC-3'	Cebador posterior para amplificación de P_{manP} para estudio de promotor
s5208	5'-GGTACCATTTCTTGCTGAATA-3'	Amplificación de Región P_{manR} a partir de pSUN279.2

(continuación)

Oligonucleótido	Secuencia	Propósito
s5209	5'-CTTAAGCCTGTCAGTATCTACTTGAG-3'	Amplificación de Región PmanR a partir de pSUN279.2
s5262	5'-AAAAAAGCTAGCGTTTAAACAAAAAGCGATT TTAATGAGCTG-3'	Cebador delantero para amplificación de $P_{manp\Delta 4}$

Experimento 1:

Aislamiento de fragmento de ADN que llevan las regiones promotoras del operón de manosa y determinación de sitios de iniciación de transcripción del promotor manR y promotor manP.

Se aísla ADN cromosómico de Bacillus subtilis168 al utilizar Equipo DNeasy Blood & Tissuede Qiagen (Hilden, Alemania).

Un fragmento de ADN de aproximadamente 2.3 kb con la ManR completo con el promotor manR putativo y la región intergénica entre manR y manP se amplifica para el ADN obtenido mediante PCR que utiliza el cebador s4693/s4694.

El fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 2.3 kb se utiliza para un experimento de extensión de cebador para determinar los sitios de iniciación de transcripción de promotor manR y promotor manP.

Para el aislamiento de mARN para la extensión de cebador se construye un factor de lanzadera a partir del vector de E.coli pIC20HE (Altenbuchner et al., 1992, Methods Enzymol. 216, 457-466) y el vector de B.subtilis pUB110 (MacKenzie et al., 1986, Plásmido 15, 93-103). El vector contiene el gen lys como gen indicador, que codifica la forma madura de la lisostafina a partir de Staphylococcus simulans (Recsai et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1127-1131).

En este derivado pUB110 de alto número de copias se clona el fragmento de ADN 2.3 kb en dirección 5' al gen de lisostafina. El plásmido resultante se nombra pSUN178.4 y se introduce en Bacillus subtilis 3NA.

Se hace crecer el Bacillus subtilis 3NA con el plásmido pSUN178.4 en medio LB con kanamicina. En la fase de crecimiento exponencial el cultivo se induce con 0.2 % de manosa. Después de 1 hora de crecimiento a 37° C las células inducidas y no inducidas se cosechan. Se aísla ARN total con el Mini Equipo Qiagen-RNeasy.

Con Cy5 en los cebadores marcados de extremo 5 se utilizan s5006, s5007, s5097 y s5098.

El cebador s5006 y s5007 se hibrida respectivamente a partir de +21 a +50 y a partir de +76 a +105 con respecto al codón de inicio del gen lisostafina. El cebador s5097 y s5098 se hibrida respectivamente a partir de +81 a +101 y a partir de +131 a +153 con respecto al codón de inicio de manR.

Los mismos cebadores se utilizan para la reacción de secuenciación de ADN del plásmido de pSUN178.4, que sirve como estándar de tamaño. La Transcriptasa Inversa AMV y la polimerasa de ADN T7d Roche se utilizan, respectivamente, para la transcripción inversa y secuenciación de ADN. Los productos de la transcripción inversa y la secuenciación se analizan sobre un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturalizado (GE healthcare). Todos los otros reactivos se proporcionan por el Equipo de Secuenciación Amershan Pharmacia Biotech AutoRead.

Se determina el sitio de iniciación de transcripción del promotor manP al utilizar el cebador s5006. Se preparan reacciones de secuencia de ADN del plásmido pSUN 178.4 con el mismo cebador y se corren sobre el mismo gel de desnaturalización para comparación. La Figura 1 muestra la secuencia de ADN alrededor del promotor manP con el sitio de iniciación de transcripción en A (nucleótido de adenina) que se resalta. Las secuencias -10 y -35 deducidas están en cursiva, el final del gen manR y el inicio del gen lys se marcan por flechas, se subrayan los sitios de restricción para Bgl-II, XbaI, AflII y NdeI.

Se determina el sitio de iniciación de transcripción de promotor manR con ARN aislamiento y secuenciación de ADN que se lleva a cabo como se describió anteriormente con respecto al promotor manP excepto que se utiliza el cebador s5098 que se une en el gen manR.

En las figuras 2 y 3 la secuencia de ADN de la región promotora manR se muestra con el sitio de iniciación de transcripción en G (nucleótido guanina) que se resalta, las secuencias -10 y -35 deducidas en cursiva, y el inicio del gen lys y el gen manR, respectivamente, se indican por una flecha. Se subrayan los sitios de restricción y una secuencia cre putativa.

La transcripción a partir del promotor manR y en particular del promotor manP se incrementa fuertemente cuando se inducen las células por manosa como se ve por las señales más fuertes en el experimento de extensión de cebador.

Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 1 anterior.

Experimento 2

Elexperimento de extensión de cebador de acuerdo con el Experimento 1 ubica el sitio de iniciación de transcripción del promotor manP cerca del extremo 3' de la región intergénica entre manR y el comienzo de manP. Para determinar la región promotora manP más precisamente el fragmento 2.3 kb de ADN se acorta etapa por etapa mediante amplificación PCR, los fragmentos de secuencia obtenidos de diferentes longitudes se clonan de nuevo al mismo vector de expresión básico y se estudia la expresión.

a) Construcción de vector básico de expresión

Se construye un vector de expresión sin promotor lacZ como gen indicador. El vector de expresión se diseña como un vector lanzadera capaz de replicación en B.subtilis y en E.coli y llamado pSUN272.1.

El gen indicador lacZ se corta con NdeI y XmaI a partir de pLA2 (Haldimann A. et al, 2001, J. Bacteriol. 183, 6384-6393) y se liga en pJOE5531.1, un derivado del vector de expresión inducible por ramnosa pWA21 (Wegerer et al., 2008, BMC. Biotechnol. 8, 2) que contiene el terminador de transcripción tufA del B.subtilis sen el sitio XmaI. En este plásmido se inserta un par de oligonucleótidos s4956/4957 entre los sitios de restricción AflII/MunI con el fin de agregar el mismo terminador de transcripción tufA en dirección 5' de lacZ. Aso se evita la "lectura a través de" a partir de promotores de plásmido en lacZ así como también "lectura a través de" fuera del lacZ en las secuencias de plásmido de flanqueo por los terminadores. Un gen con resistencia a espectinomicina spc para E.coli y B.subtilis se amplifica a partir de plásmido pDG1730 (Geurout-Fleury et al., 1996, Gene 180, 57-61) con oligonucleótidos s4833/4835 y se inserta en el plásmido obtenido anteriormente. Además, parte del vector E.coli se acorta al eliminar un fragmento BspHI/HindIII. Posteriormente, un fragmento EcoRI/SpHI con la región de replicación de B.subtilis pNTLBS72 (Lagodich et al., 2005, Mol. Biol. (Mosk) 39, 345-348) se liga en el plásmido.

El fragmento 2.3 kb de ADN obtenido en el Experimento 1 se inserta en pSUN272.1 en frente del lacZ al digerir con AflII y NheI y ligadura, obteniendo de esta forma el vector de expresión pSUN279.2 con el mapa de plásmido como se muestra en la figura 4.

Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 1 anterior.

b) Determinación de eficiencia de expresión del vector pSUN279.2

Los plásmidos pSUN279.2 y pSUN272.1 obtenidos en a) anteriormente se llevan en B.subtilis 3NA. El último sirve como control de fondo. Las cepas de B.subtilis 3NA que llevan uno al otro plásmido se hacen crecer en medio LB con espectinomicina y en la fase de crecimiento exponencial ya sea con 0.2% de manosa, 0.2% de manosa más 0.2% de glucosa o sin azúcar (control no inducido) se agregan a los cultivos para inducción. Después de una hora se determina la inducción de la actividad de β-galactosidasa de las células a través del ensayo Miller. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 7.

El cultivo no inducido de B.subtilis que contiene pSUN279.2 muestra ya un nivel basal muy alto de actividad de β-galactosidasa. La presencia de manosa resulta en un incremento adicional de 4 veces de actividad de β-galactosidasa mientras que la actividad con manosa y glucosa se reduce pero aún muy por encima del nivel basal. Los resultados indican claramente que la actividad del promotor vista en pSUN279.2 se puede originar a partir de la región entre manR y manP, a partir de la región en dirección 5' de manR o a partir de ambas.

Por lo tanto, la región en dirección 5' de manR así como también la mayor parte de manR se eliminan de w pSUN279.2 al cortar el fragmento 2.3 kb de ADN de pSUN279.2 como se muestra en la figura 4 entre SfoI y NruI para producir el plásmido pSUN284.1.

La secuencia de ácidos nucleicos resultante de pSUN284.1 se muestra en la figura 6.

El B.subtilis 3NA se transforma con este plásmido pSUN284.1 y la eficiencia de expresión se determina como se estableció anteriormente. El resultado se muestra en la figura 5. Como se puede ver a partir de la figura 5 este vector que elimina a manR pSUN284.1 en B.subtilis 3NA muestra solo aproximadamente la mitad del nivel basal de la actividad de β- galactosidasa comparado con pSUN279.2 en B.subtilis 3NA, un incremento incluso más fuerte mediante inducción con manosa y de nuevo una reducción más fuerte en la presencia de glucosa. Estos resultados prueban que el promotor manP se ubica entre manR y manP y muestra que la copia cromosómica de manR es suficiente para regular todas las copias de promotor manP sobre los plásmidos de bajo número de copias.

c) Ubicación de la región promotora manP

Para ubicar la región promotora de manP además de los fragmentos acortados de ADN de pSUN284.1 se preparan fragmentos de secuencia cortos adicionales a partir del fragmento 2.3 kb de ADN al cortar en diferentes posiciones

en dirección 5’ al sitio de iniciación de transcripción de promotor manP en sitios de restricción y mediante enzimas de restricción como se muestra en la figura 6.

La eliminación por debajo de bp -81 y bp -80 en dirección 5’ al sitio de iniciación de transcripción de manP resulta en una segunda secuencia de eliminación que comprende la SEQ ID NO. 1.

Se lleva a cabo una eliminación adicional por debajo de bp -41 y bp -40 en dirección 5’ hacia al sitio de iniciación de transcripción de manP (tercera secuencia de eliminación).

Los plásmidos que comprenden la segunda secuencia de eliminación, pSUN290, y la tercera secuencia de eliminación, pSUN297.5 se construyen en una forma similar como el plásmido pSUN284.1 en 2b) anterior, al insertar los productos de PCR amplificados con cebadores s4802/s5203 y s5262/s5203, respectivamente, en pSUN272.1 a través de enzimas de restricción EcoRV y NheI.

Los plásmidos se insertan en B.subtiles 3NA y se cultivan como se estableció anteriormente en b) Después de 1 hora de inducción la actividad de β- galactosidasa de las células se determina como se establece en b) anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 7.

Como se muestra en la figura 7 ninguna de las cepas con pSUN290 y pSUN284.1 muestran una diferencia significativa que se relaciona con la inducción de lacZ mediante manosa. Sin embargo, en B.subtilis 3NA que comprende pSUN297.5 con la tercera secuencia de eliminación, la inducción por manosa se suprime completamente y el nivel de expresión basal está cercano a 0. A partir de estos resultados luego que se ubica el sitio de unión ManR del promotor manP de la región de manosa entre bp -80 y -35 con respecto al sitio de iniciación de transcripción de manP.

Experimento 3: Determinación de promotor manR

a) Identificación de secuencia cre

En razón a que la mayoría de CCR se media a través de proteína de control de catabolito A (CcpA) se lleva a cabo una búsqueda para los sitios de unión respectivos (secuencia cre) en el operón de manosa completo que utiliza la función de alineación de ADN en el programa de Manejo de Clon. Para la alineación se utiliza la secuencia consensus cre 5’-WWTGNAARCGNWWWCAWW-3’.

Solo en la región promotora de manR se encuentra una secuencia cre putativa como se muestra en las figuras 2 y 3 que se ubica en dirección 3’ a la secuencia 10.

La SEQ ID NO. 3 de la presente invención abarca la región de inicio desde bp -122 hasta el codón de inicio de lacZ, la SEQ ID NO. 4 abarca la región de inicio desde bp -122 hasta bp+7 (inclusive) y la SEQ ID NO. 5 de la presente invención abarca la región de inicio desde bp -122 hasta bp-1 (inclusive) de la secuencia mostrada en la figura 3.

b) Evaluación de eficiencia de expresión de promotor manR

Para evaluar la eficiencia de expresión del promotor manR un vector de expresión similar a pSUN284.1 se construye como se estableció anteriormente y se denomina pSUN291. Para esto, un fragmento de ADN que incluye el promotor manR putativo y aproximadamente 600 bp en dirección 5’ de manR se amplifica con el cebador s5208/s5209 y se linealiza ADN de plásmido pSUN279.2 como plantilla y se inserta en frente de lacZ en el plásmido pSUN272.1, al ingerir con KpnI y AflIII y ligadura.

La secuencia de ADN se muestra en la figura 3.

Se introduce el plásmido pSUN291 en B.subtilis 3NA y se mide la actividad de β- galactosidasa como se estableció anteriormente en los experimentos 2 b).

El resultado se muestra en la figura 5. Aquí, la expresión basal ya es relativamente alta y se incrementa adicionalmente adición de tres veces de 0.2% de manosa. La adición de glucosa lleva a la represión de la actividad de β- galactosidasa a cerca del nivel de expresión basal.

El resultado indica que el promotor manR no es solo un promotor constitutivo débil sino que se somete a manosa y regulación de CCR.

c) Ubicación de la región promotora manR

Como en el experimento 2c) para ubicación adicional de la región promotora de manR se prepara secuencias de ADN fragmentos de ADN de diferentes longitudes a partir de las secuencias de ADN que están contenidas en pSUN291 al cortar en diferentes posiciones en dirección 5’ con el sitio de iniciación de transcripción de promotor manR en sitios de restricción y mediante enzimas de restricción como se muestra en la figura 3.

Se obtiene una primera secuencia de eliminación al cortar la secuencia mostrada en la figura 3 por debajo de bp -100 y bp -99 en dirección 5' del sitio de iniciación de transcripción G, se obtiene una segunda secuencia de eliminación al cortar por debajo de bp -83 y bp -82 en dirección 5' del sitio de iniciación de transcripción G.

Análogo al experimento 2c) la primera y segunda secuencias de eliminación se introducen en pSUN272.1 y los plásmidos resultantes se denominan pSUN384.1 y pSUN385.2, respectivamente.

Cada plásmido se inserta en B.subtilis 3NA y se cultiva como se establece en el experimento 2b. Después de una hora de inducción la actividad de β- galactosidasa de las células se determina como se establece en experimento 2b. Los resultados se muestran en la figura 8. No hay diferencia significativa que se relaciona con la inducción de lacZ mediante manosa de pSUN384.1 en comparación con pSUN291. Sin embargo, en B.subtilis 3NA que comprende pSUN385.2 con la segunda secuencia de eliminación, la inducción mediante manosa se suprime completamente y el nivel de expresión basal es cercano a 0. A partir de estos resultados luego que el sitio de unión ManR de la región promotora manR se ubica entre bp-99 y bp-35 con respecto a la iniciación de transcripción lateral de manR.

II) Uso de las regiones promotoras de operón de manosa en fermentación con alta densidad celular

Experimento 4: Transformación

Un anfitrión modelo que lleva la región promotora de la presente invención se ensaya su capacidad de crecimiento y expresión. Utilizando la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la región promotora manP que se introduce en el plásmido pSUN284.1 como se muestra en la figura 6 y como se utiliza en el experimento 2c, el plásmido pMW168.1 se construye como se establece adelante y se introduce en B.subtilis 3NA como anfitrión mediante transformación.

a) Construcción de plásmido pMW168.1

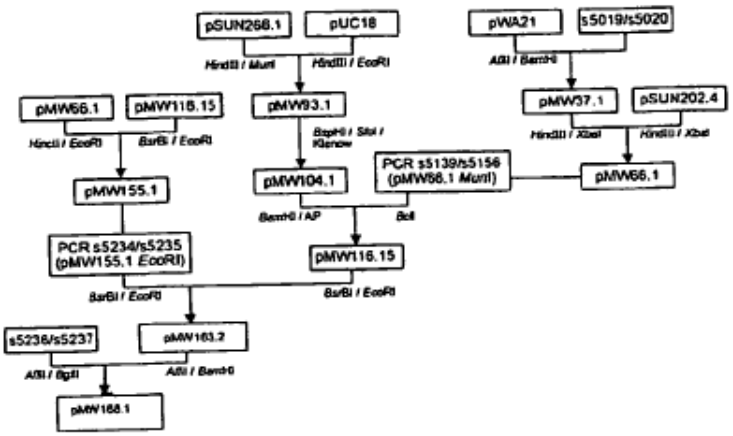
Un vector lanzadera replicable en E.coli y B.subtilis se diseña como se establece en el Experimento 2a) con la excepción que se utiliza eGFP como gen indicador en ligar de lacZ. También la región de iniciación de transcripción de manP se reemplaza por aquella del gen gsiB (Proteína de estrés; Jürgen et al., supra).

Adicionalmente, se reemplazan el codón de inicio de eGFP y los 6 codones que siguen al codón de inicio.

La estructura esquemática del promotor obtenido y la región de iniciación de transcripción es como sigue:

Se muestra la disposición de los genes (flechas) y las regiones (secuencias) con los sitios de restricción relevantes.

De manera general, el plásmido pMW168.1 se obtiene como se muestra en el siguiente diagrama de flujo:



En el diagrama de flujo los nombres de los ADN vectores, los ADN insertos y los oligonucleótidos complementarios utilizados son como se indica en los recuadros, con respecto a los productos de PCR, los cebadores y ADN plantilla

están dentro de los paréntesis, las enzimas de restricción utilizadas se indican en los respectivos sitios. Se llevan a cabo etapas de clonación con E.coli JM109.

Los plásmidos utilizados son pUC 118 una selección positiva y vector de clonación para productos PCR con resistencia amp (Yanosch-Perron et al., supra); el pWA21 un vector de expresión y clonación para E.coli con resistencia amp (Wegerer et al., 2008, BMC Biotechnol. 8,2); el pSUN202.4 un derivado de pUB 110 con región promotora manP y resistencia amp y kan, es un vector lanzadera para E.coli y B.subtilis; y el pSUN266.1 un derivado de pUC18 con sitio de integración entre secuencias ter y spc y resistencia amp.

La secuencia de los cebadores utilizada es como sigue:

Nombre	secuencia 5' → 3'	descripción
s5019	ttaagCTCTTAAGGAGGATTTTAGAATGGCTAAAGAAAAATTCg	TI-Región tufA
s5020	ttaagGAATTTTTCTTTAGCCATTCTAAAATCCTCCTTAAGAGg	TI-Región tufA (compl.)
S5139	aaaaaatgatcaTTACTTGTACAGCTCGTC	cebador f PmanP-eGFP
S5156	aaaaaatgatcaccggtCGATTGCCACATTAAAGG	cebador r PmanP-eGFP
s5234	aaaaaaccgCTCGTCTTCCTAAGCATCCT	cebador f rep (pUB110)
S5235	aaaaaagaatTCGAGATCAGGGAATGAGTTT	cebador r rep (pUB110)
S5236	ttaagAATTAAAGGAGGAATTCAAAATGGCAGACAATAACAAAg	TI-Región gsiB
s5237	gatccTTTGTTATTGTCTGCCATTTTGAATTCCTCCTTTAATTc	TI-Región gsiB (compl.)

El reemplazo de la región de iniciación de transcripción inclusive el codón de inicio y los codones que siguen al codón de inicio se llevan a cabo utilizando oligonucleótidos complementarios y a través de los sitios sensillos de restricción BglII, AflII y BamHI. La construcción del vector inicia con el reemplazo de la región de iniciación de transcripción del gene T7 10 del vector pWA21 (Wegerer et al., supra) mediante la región de iniciación de traducción de tufA de B.subtilis a través de los oligonucleótidos complementarios s5019 y s5020, respectivamente. En etapas de clonación adicionales esta región de iniciación de transcripción se reemplaza por aquella de gsiB. El plásmido final pMW168.1 contiene el gen rep inclusive ori^+ de pUB110.

El mapa de plásmido de pMW168.1 se muestra en la figura 9.

b) Determinación de estabilidad estructural y segregación

B.subtilis 3NA se transforma con el vector pMW168.1 y se determina la estabilidad estructural así como también propagación estable del vector sobre ña división celular (segregación).

El B.subtilis 3NA transformado con pMW168.1 se precultiva en medio LB_{Spc} y luego se transfiere en medio LB_0 sin presión de selección.

La incubación se lleva a cabo a 37° C. al final de la fase de crecimiento exponencial cada cultivo se inocula en medio LB_0 fresco. Este procedimiento se repite hasta 100 generaciones, se obtienen calculado con base en valores UD obtenidos durante la transferencia en medio fresco de acuerdo con el método modificado de Harwood et al., 1990, Molecular Biolegical Methods for Bacillus, John Wiley & Sons Ltd.

El resultado se muestra en la figura 10.

Después de aproximadamente 15 generaciones más del 99,9 % de las células e incluso después de 20 generaciones aproximadamente 90 % de las células todavía llevan el vector. Solo a partir de aproximadamente la generación 25^{ava} más y más células puerden el vector.

Para determinar la estabilidad estructural del plásmido, a partir de 20 colonias se aísla el plásmido después de 15 generaciones. Aproximadamente 0.5 µg de cada plásmido aislado se compara con pMW168.1 aislado a partir de

E.coli como control mediante electroforesis en gel de agarosa. No se observan diferencias en las series de los plásmidos y el control lo que indica que no ha ocurrido variación estructural.

Estos resultados muestran que el plásmido pMW168.1 no solo tiene un alta estabilidad estructural sino también segregación estable según se desee en la fermentación.

Experimento 5: Fermentación

Se conducen seis series de fermentación con B.subtilis 3NA transformado m con plásmido pMW168.1 que comprende el gen indicador eGFP con diferentes regímenes de inducción y se monitorea en línea al observar la señal de fluorescencia de eGFP.

Como medio de fermentación se utiliza el medio conocido para fermentación de alta densidad de E.coli como se describe en Wilms et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 73, 95-103, y como se muestra en lo siguiente.

Materiales y métodos

En general, también para los experimentos de fermentación se utilizan técnicas moleculares estándar no establecidas de otra forma.

Densidad óptica

Para determinar la densidad óptica (OD) se utilizan el espectrofotómetro Ultrospec 1100pro de Amersham Bioscience Company a 600 nm de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Determinación de la concentración de biomasa seca

Para la determinación de la concentración de biomasa seca c_x se utiliza un medidor de humedad MB 835 Halogen de Ohaus Company.

Medición Espectofotométrica de fluorescencia

Se analiza la expresión y fluorescencia, respectivamente, de eGFP mediante el lector de Multifunción GENios de TECAN Company utilizando el software lector X Fluor 4 (versión V4.11) con los siguientes parámetros de medición:

Parámetro de medición	Valor
Filtro de excitación	485 nm
Filtro de emisión	535 nm
Ganancia (manual)	60
Tiempo de Integración	20 ms
Número de matraces	3
Modo de lectura	superior

Medición de florescencia en línea en fermentador

Durante la fermentación, la expresión de eGFP se monitorea en línea utilizando la sonda de fluorescencia (Micropack HPX-2000, Xenon de Alta Potencia Luminosa de Ocean Optics, Inc.; espectrómetro de fibra óptica S2000).

Los parámetros de medición son como sigue: filtro de excitación 485 nm, filtro de emisión de 535 nm, filtro de 0.6). Para la grabación y el almacenamiento se utiliza software de Ocean Optics SpectraSuite.

La fluorescencia se indica como unidad de fluorescencia relativa (RFU). Poco antes de la obtención de 4.000 RFU el tiempo de integración de 50 ms se cambia a 25 ms y, luego a 10 ms. En estos casos, los valores de medición se multiplican por el factor 2 y 5, respectivamente.

Cultivo de pre-cultivos

Una única colonia se coloca sobre una placa de agar LB y se cultiva durante la noche en 5 ml de medio mínimo Spizizens (SMM) que incluye 0,02% (p/v) de De Casaminoácidos (CA) y el antibiótico. Se agrega 1 ml de cultivo durante la noche a 20 ml de SMM con 0,02% (p/v) de De Ca y se incuban 5-6 h antibiótico y a 37 ° C en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (precultivo 1).

Se agregan 10 ml de precultivo 1 a 200 ml de medio en tanda que incluyend5 g/l de glucosa y se incuban hasta 8 horas a 37 ° C en un matraz Erlenmeyer 1l (precultivo 2). Para la inoculación de los fermentadores se utilizó cultivo pre-2 con OD_{600} entre 1.2 y 2.2.

Fermentación

En general, la fermentación se lleva a cabo de acuerdo con los principios de Wilms et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 73, 95-103.

Tan pronto como la glucosa, la fuente de carbono, se consume completamente el modo de tanda se conmuta al modo de tanda de carga.

Al agregar las soluciones de carga exponencialmente en la fase de tanda de carga, se puede obtener un índice de crecimiento constante de $\mu = 0{,}10\ h^{-1}$ y al mismo tiempo se evita represión catabólica por glucosa, a causa del consumo inmediato de la glucosa por las células.

Análisis de proteína

Los extractos de proteína cruda de las células cosechadas se analizan por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida con un gel de poliacrilamida que consiste de 3% de gel de apilamiento y el 12% de gel de separación con la siguiente composición:

Componente	gel de apilamiento (3 %)	gel de separación (12 %)
H_2O desionizada	3.00 ml	6.70 ml
TRIS 0.5 M pH 6.8	1.25 ml	-
TRIS 1.5 M pH 8.8	-	5.00 ml
SDS 10 % (p/v)	0.05 ml	0.20 ml
acril amida 30 % (p/v)	0.67 ml	8.00 ml
APS 10 % (p/v)	0.05 ml	0.10 ml
TEMED	0.005 ml	0.01 ml

Se utiliza una cámara Mini gel Doble de Biometra company.

Para la desnaturalización se mezcla 12 ml de extracto crudo de la mezcla de proteína con 3 ml 5x regulador de aplicación SDS y se incuban en Thermomixer 5438 de Eppendorf company durante 5 minutos a 95° C. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, las muestras se separan mediante centrifugación y se colocan completamente en gel.

Durante la separación en el gel de apilamiento la corriente es de 10 mA y se aumenta a 20 mA después de que la frontiere de bromofenol alcanza el gel de apilamiento. El regulador de funcionamiento 1 XSD-y las longitudes estándar ROTI ®-marca de Roth company se utilizan para la separación. La electroforesis se termina tan pronto como la frontiere bromofenol se corre completamente fuera del gel. Para la detección de distintas proteínas bys se incuba el gel con solución de tinción de Coomassie durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y se trata posteriormente con una solución de tinción durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Para retirar el fondo azulado restante del gel, el gel se incuba durante varias horas en 3,5% de ácido acético.

La composición de soluciones reguladoras y de la tinción así como también soluciones de sin tinción son como sigue:

Regulador/solución	Componentes	Concentración
Solución de Tinción con Coomassie	Coomassie R250	2.0 g
	Coomassie G250	0.5 g
	EtOH	425 ml
	MeOH	50 ml
	ácido acético glacial	100 ml
	H_2O desionizada	ad 1.0 l
solución son tinción	EtOH	450 ml
	ácido acético glacial	100 ml
	H_2O desionizada	450 ml
Regulador de aplicación 5x	TRIS/HCl (2 M, pH 6.8)	6.25 ml
	EDTA	0.146 g
	SDS (40 % (p/v))	6.25 ml
	β-mercaptoetanol (puro)	2.50 ml
	glicerina (86 % (v/v))	29.00 ml
	Azul de Bromfenol	0.05 g
	H_2O desionizada	ad 50 ml
Regulador de funcionamiento 10x	TRIS	30 g
	glicina	144 g
	SDS (20 % (p/v))	50 ml
	H_2O desionizada	ad 1.0 l

Con TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

SDS: dodecilsulfato de sodio

APS: persulfato de amonio

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina,

EDTA: ácido Etilenodiaminetetraacético.

Inducción de la expresión de gen

Para la inducción de la expresión de gen se evalúan diferentes modos de adición de la solución de inductor (régimen de inducción):

1. Adición en una única porción en un punto de tiempo dado (inducción de impacto)

2. Inducción de Impacto combinada con una inducción adicional durante un intervalo de tiempo en donde

- la adición adicional es un índice constante con forma de etapa que incrementa las cantidades o

- la adición adicional tiene un índice que se incrementa exponencialmente,

3. Inicio de la adición de solución de inductor luego de alcanzar una densidad celular.

Tabla 2: Medios utilizados

Medio	Componente	concentración
Medio LB_0 (pH 7.2)	Triptón	10.0 g
	extracto de levadura	5.0 g
	NaCl	5.0 g
	H_2O, desionizada	ad 1.0 l
Medio Mínimo Spizizens (SMM)	$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
	KH_2PO_4	6.0 g
	K_2HPO_4	14.0 g
	Citrato de Na_3	1.0 g
	$MgSO_4$	0.2 g
	D-Glucosa*	5.0 g
	H_2O, desionizada	ad 1.0 l
Medio de tanda para fermentaciones de B. subtilis	$(NH_4)_2$H-Citrato	1.00 g/l
	Na_2SO_4	2.68 g/l
	$(NH_4)_2SO_4$	0.50 g/l
	NH_4Cl	0.50 g/l
	K_2HPO_4	14.60 g/l
	$NaH_2PO_4xH_2O$	4.00 g/l
	D-Glucosa*	25.00 g/l
	$MgSO_4$(1 m)*	2.00 ml/l
	TES* (como adelante)	3.00 ml/l
Solución de oligolementos (TES)	$CaCl_2x_2$ H_2O	0.50 g/l
	$FeCl_3$x6 H_2O	16.70 g/l
	Na_2-EDTA	20.10 g/l
	$ZnSo_4$x7 H_2O	0.18 g/l
	$MnSo_4xH_2O$	0.10 g/l
	$CuSo_4$x5 H_2O	0.16 g/l
	$CoCl_2$x6 H_2O	0.18 g/l
*para ser sometida a autoclave de forma separada		

El pH se ajusta con soluciónde NaOH 2 M y HCl 1 M, respectivamente. Para las placas de agar se agregan adicionalmente 15 g/l de Euroagar de BD company.

Todos los medios se sometwn a autoclave a 121° C durante aproximadamente 30 min.

Serie de fermentación 1: Inducción de impacto

La serie de fermentación 1 se lleva a cabo en un reactor 301 (D598 y D596 de Bioengineering). El volumen de tanda es 81. Dependiendo de OD_{600} se inoculan 200-400 ml de pre-cultivo 2 para ajustar el inicio OD_{600} a 0.1.

Durante la fase de tanda la temperatura es 30° C durante la noche y después de 12 h se incrementa a 37° C. Mediante adición de 24 % (v/v) de NH_4OH el pH se ajusta a aproximadamente 7.0 durante la fermentación completa. El índice de aeración se puede ajustar hasta 30 l/min. En el comienzo de la fase de tanda el índice de aeración es 10 l/min.

La composición de los medios de carga I y II se muestra como adelante en la tabla 3.

Tabla 3: composición de medios de carga I y II

Medio de carga I		Medio de carga II	
Componente	Concentración	Componente	Concentración
glucosa * H_2O	654.76 g/l	$(NH_4)_2HPO_4$	396.00 g/l
$MgSO_4$ * 7 H_2O	25.50 g/l	Ajustado a pH 7.0	
*TES	120.00 ml/l	Volumen total 1.0 l	
H_2O desionizada	ad 4.2 l	H_2O, desionizada	ad 1.0 l
*Solución de oligolementos		pH 7.0	

Los medios I y II se agregan en proporción a sus volúmenes totales, es decir 4.2:1.0 (que corresponde a 76.2% del medio I y 23.8% del medio II de la carga total F).

Para inducción en el comienzo de la fase de tanda de carga 0.2 % (p/v) de solución de D-manosa se agrega en una porción.

La concentración de biomasa seca y la señal de fluorescencia monitoreada se muestran en las figuras 11a y 11b, respectivamente.

En la figura la concentración de la biomasa seca c_x se grafica logarítmicamente sobre la duración del cultivo. La fase de tanda y de tanda de carga se separa por la línea perpendicular.

La señal de fluorescencia monitoreada en longitud de onda de emisión de 535 nm se grafica sobre el periodo de cultivo. Las flechas indican el punto de inducción.

A partir de la figura 11a resulta que una concentración de biomasa seca máxima (DM) de 82.75 g DM/l se obtiene que corresponde a aproximadamente 970 g de DM se basa sobre el volumen de reacción de 11.7 l.

En total 71,5 g de D-manosa inductora se consume con 16 g en la primera adición.

El índice de crecimiento específico es de 0.10 h^{-1} durante la fase de tanda de carga total.

Como se muestra en la figura 11b la señal de fluorescencia se incrementa fuertemente después de la primera adición de D-manosa, hasta un máximo de aproximadamente 2200 RFU dentro de las primeras cinco horas de la fase de tanda de carga. Entonces, la señal disminuye constantemente. Se supone que esta disminución en el índice de expresión se debe al consumo del inductor y/o a un efecto de protección por la masa celular creciente. Una adición de otros 0.5% (p/v) de solución de manosa después de 37 horas da como resultado un nuevo aumento de la señal de fluorescencia hasta un valor de RFU 2100.

Serie de fermentación 2: inducción combinada con índice constante

El mismo procedimiento que en la serie 1 se repite excepto que se cambia el modo de adición de inductor. Como en la serie 1 se agrega 0.2% (p/v) de solución de D-manosa en una sola porción en el punto inicial de la fase de tanda de carga. La adición de la segunda porción del inductor se inicia tan pronto como la RFU en el punto de inflexión de la curva de la señal de fluorescencia de la serie 1 se alcanza, es decir 1500. Durante la segunda etapa de adición se agrega 20% (p/v) de solución de manosa a un índice constante con cantidades que crecen en forma de etapas con un índice promedio de 0.39 g/min hasta que se ha agregado toda la segunda porción.

Los resultados mostrados en las figuras 12a y 12b muestran que la concentración de biomasa seca y la curva de la señal de fluorescencia, con la detonación es la misma como en las figuras 11 a y 11 b. En la figura 12b los puntos de adición de la primera porción y el inicio y fin de la adición de la segunda porción se indican por flechas.

Como resultado de la figura 12a la concentración máxima de biomasa seca es 67.6 gDM/l que corresponde a aproximadamente 804 g DM con base en una volumen de reacción de 11.9 l. En total se agregan (primera y segunda adición) 70 g de D-manosa.

La producción de biomasa se reduce en un 17% en comparación con la serie 1. Esto se correlaciona con un menor índice de crecimiento específico $\mu = 0.09\ h^{-1}$ durante la carga de la fase de tanda de carga, mientras que el índice de crecimiento específico durante la fase de tanda es de $0.43\ h^{-1}$.

Como resultado de figura 12b el máximo de la señal de fluorescencia se alcanza a aproximadamente 4900 RFU después de 25 horas y se disminuye continuamente hasta aproximadamente 2500 RFU.

En comparación la serie 1 en la serie 2 el índice de expresión se podría mejorar en un 120% con una ligera disminución en la concentración de biomasa.

Series de fermentación 3 y 4: inducción combinada con índice exponencial

Un fermentador de laboratorio pequeño de 3,7 l (Kleinlaborfermentor de Bioengineering Company) se utiliza en las series 3 y 4. El volumen de tanda (medio de tanda más inóculo) es 1.5 l en total. Dependiendo del OD_{600} se inoculan 100 a 200 ml de precultivo 2 para ajustar el inicio de OD_{600} a aproximadamente 0.1. La temperatura en la tanda y la fase de tanda de carga es de 37° C. Durante la fermentación, el pH se ajusta a 7.0 por 2 m de NaOH o 24% (v/v) de NH_4OH. El índice de aireación es constantemente 2 l/min durante la fermentación. La entrada de oxígeno se ajusta por la velocidad de rotación del agitador. La presión de fermentación es 1.3 bar al comienzo y luego se aumenta a 1.5 bar para mejorar la entrada de oxígeno en la demanda. Después de completar el consumo de la fuente de carbono glucosa se activa la operación de carga de tanda a la operación de tanda de carga.

A diferencia de la serie 2 en las series 3 y 4 la solución inductora se carga a un índice exponencialmente creciente. Adicionalmente, el medio que contiene glucosa I se co-carga con el inductor que contiene el medio II. La composición del medio de carga I y II son como se muestra adelante en la tabla 4:

Tabla 4: Composición del medio de carga I y II

Medio de carga I		Medio de carga II	
Componente	Concentración	Componente	Concentración
D-glucosa	500 g/l	D-manosa	200 g/l
TES	-	TES	40 ml/l
$MgSO_4$	120.37ml/l	$MgSO_4$	3.85 g/l
$(NH_4)\ HPO_4$	158.40 g/l	(NH)4HPO4	63.36 g/l
H_2O, desionizada	ad 1.0 l	H_2O, desionizada	ad 0.25 l (serie 3)
			ad 0.1 l (serie 4)

Todos los Componentes de los medios I y II se someten a autoclave en forma separada, el valor de pH se ajusta a 0.3 con 85 % (v/v) de H_3PO_4 en ambos medios debido a la solubilidad de los componentes.

Se calcula la carga total F en tiempo t mediante la siguiente fórmula:

$$F(t) = \left[\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m\right] \cdot \frac{C_{x0} \cdot V_0}{C_{s0}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t}$$

Con

m = coeficiente de mantenimiento • ($0.04\ g\ g^{-1}H^{-1}$)

$Y_{x/s}$ = coefieciente de rendimiento específico de la biomasa relacionado con el sustrato (0.5 para glucosa)

C_{x0} = concentración de biomasa como inicio de la fase de tanda de carga

V_0 = volumen del al inicio de la fase de tanda de carga (= volumen de tanda)

C_{s0} = concentración de glucosa en solución de carga

Para el cálculo se supone que la D-manosa fue consumida por B.subtiles con un coeficiente de rendimiento comparable $Y_{X/s}$ glucosa.

En el KLF los medios I y II se podrían suministrar por separado y se puede variar la relación proporcional.

a) Serie de Fermentación 3

La concentración de biomasa y la señal de fluorescencia monitoreada se muestran en las figuras 13a y 13b, con la denotación de que las figuras son iguales como en la serie 1.

Al comienzo de la fase de tanda de carga se agrega una porción de 0.2% (p/v) de solución de manosa (16 g de manosa en total) y los medios de carga exponencial I y II se inician con una relación de 50: 50 (intervalo I). En la disminución de la pendiente de la porción de medio que contiene manosa II se mejora a 60% y la carga total F (medios I y II) al 125% para mantener el crecimiento sobre la base de la glucosa (intervalo II). Después de aproximadamente 2 h de nuevo se monitorea una disminución de la pendiente y la porción de los medios II aumenta a 66,6% con aumento simultáneo de la carga total F a 150% (intervalo III). Después del consumo de todos los medios II, la fermentación se continua con los medios de carga I en una carga total de 100% (no mostrado en la figura 10).

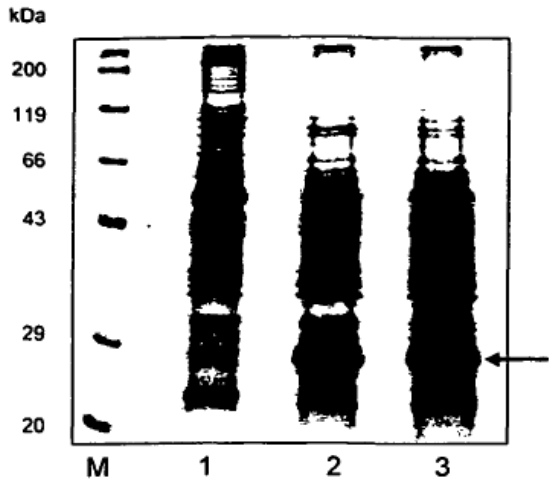
El progreso y datos de la serie 3 se resumen en la tabla 5 adelante:

Tabla 5

intervalo [h]	medio I:II [%]	F [%]	μ [h^{-1}]	RFU	biomasa seca [gDM/l]
0-12			0.52	-	
I 12-17	50: 50	100	0.09	7000	
II 17-19	40: 60	125	0.08	9000	
III 19-22	33.4: 66.6	150	0.09	11000	22
En total se agregan 50 g de manosa.					

Cada 12 h, 20 h y 24 se toma una muestra para el análisis de la expresión en gel SDS sobre la base de las fracciones de proteínas solubles de 10 células OD_{600} en total.

El resultado de SDS PAGE se muestra adelante:



Se muestra desde la izquierda: (M) estándar de longitud (Marca ROTI®), (1) después de 12 h, no inducido; (2) después de 20 h, 8 h de inducción; (3) después de 24 horas, 12 h de inducción.

Después de 20 h y 24 h aparece un camino claro en aproximadamente 27 kDa que indica expresión de eGFP (flecha)

b) Serie de fermentación 4

El mismo procedimiento como en la serie 3 se repite excepto que el volumen de carga del medio II (manosa) se mejora a 1.0 l en total.

La concentración de biomasa seca y la señal de fluorescencia se muestran en las figuras 14a y 12b, con la denotación que es la misma como en la serie 1.

El progreso y datos se resumen en la tabla 6 adelante:

Tabla 6

intervalo [h]	medio I:II [%]	F [%]	μ [h^{-1}]	RFU	biomasa seca [gDM/l]
0-15			0.40	-	
I 15-22	50: 50	100		3500	
II 22-38	42: 58	120		10000-7800	
III 38-39	34: 66	150		8900	40.4
En total se agregan 200 g de manosa.					

Para compensar una carencia de nitrógeno observada después de aproximadamente 15 horas de duración de fermentación se carga adicionalmente $(NH_4)_2$ HPO_4 a un índice constante.

En el intervalo II se alcanza un RFU máximo de 10000 que dentro del curso del intervalo II se reduce a 7800 RFU.

a) Series de Fermentación 5 y 6: Sin inducción de impacto

Se llevan a cabo ambas fermentaciones en un fermentador de 30 l.

En ambas series las células se hacen crecer hasta alta densidad celular con índice de carga que se incrementa exponencialmente de glucosa, que, luego de alcanzar alta densidad celular, se reemplaza por una carga constante de manosa.

Los datos de carga I, II y III utilizados se muestran en la tabla 7 adelante:

Tabla 7

Medio de carga I		Medio de carga II			Medio de carga III		
Componente	Concentración		Componente	Concentración		componente	Concentración
D-glucosa*H_2O	654.76 g/l		$(NH_4)_2HPO_4$	396.00 g/l		D-manosa	400.00 g/l
MgSO4*7 H_2O	23.50 g/l					$MgSO_4$*7H_2O	23.50 g/l
TES	120.00 ml/l					SEL	120.00 ml/l
H_2O desionizada	ad 4.2 l		H_2O desionizada pH	ad 1.0 l 7.0		H_2O desionizada	ad x l

Serie de fermentación 5

se agregan los medios I y II en proporción a sus volúmenes totales 4.2:1.0 en índice que se incrementa exponencialmente. Al alcanzar alta densidad celular la carga compuesta de los medios I y II se reemplaza por la carga compuesta de los medios II y III en una relación proporcional de 20:80 a volumen constante que corresponde al volumen del último índice de carga exponencial de los medios I y II.

La señal de fluorescencia se muestra en la figura 15 con la denotación que es la misma como en la serie 1.

Se asume que el aumento mínimo de señal de fluorescencia en la figura 15 después de aproximadamente 17 h de duración e fermentación se debe a una fuga de corto plazo del medio III.

El progreso y datos de la serie 5 se resumen en la tabla 8 adelante:

Tabla 8

Fase de tanda de carga [h]	Medios [%] I:II:III	RFU max	Índice de crecimiento específico[h^{-1}]	Biomasa seca [g DM/l]	manosa total [g]
15-35	76.2: 23.8: -	-	0.1		
35-39	-: 20: 80	2800		80	150

b) Serie de fermentación 6

Se repite el mismo procedimiento como en la serie 5 excepto que en total 600 g

Se agrega manosa con una inducción de impacto de 0.2 (p/v) de solución de manosa (16 g manosa en total) antes de la adición constante de la carga compuesta de los medios II y III luego de alcanzar alta densidad celular.

La señal de fluorescencia se muestra en la figura 16, con la denotación que es la misma como en la serie 1.

El progreso y los datos de la serie 6 se resumen en la tabla 9 adelante:

Tabla 9:

fase de tanda de carga [h]	Medios [%] I:II:III	RFU max	Índice de crecimiento específico[h^{-1}]	Biomasa seca [g DM/l]	Manosa total [g]
20-40	76.2: 23.8: -	-			-
40	0.2 % (p/v) de solución de Manosa	-			16
42-53	-80: 20	14000		82	600

Evaluación de las series 1 a 6

Para evaluación en el momento de fluorescencia máxima la concentración de biomasa seca c_x, los volúmenes de V_R, la manosa consumida y la duración del inicio de inducción se determinan y resumen en la tabla 10 adelante:

Tabla 10

Serie de fermentación	Fluorescencia $_{max}$ RFU	c_x gDMl^{-1}	VR l	gMan Inductor	Duración h
1	2200	16	8.2	16	5
2	4900	22	8.3	70	8
3	11000	22	1.6	50	10
4	10000	17	1.7	60	13
5	1700	80	12.0	150	5
6	14000	82	14.7	600	12

Con base en los datos de proceso mostrados en la tabla 10 para cada serie, se calcula la productividad en términos del RFU de fluorescencia máximo por litro y hora. Adicionalmente, se expresa la eficiencia de expresión como relativa a la fluorescencia calculada a partir de la fluorescencia máxima con base en la biomasa absoluta (gDM) y la concentración de inductor (gman/L).

Los resultados se muestran en la tabla 11 adelante:

Tabla 11

Serie de fermentación	Productividad RFU l^{-1} h^{-1}	RFU de Fluorescencia Rel. (gDM)$^{-1}$	RFU de Fluorescencia Rel (man/l)$^{-1}$
1	53.7	16.8	1127.5
2	73.8	26.8	581.0

(continuación)

Serie de fermentación	Productividad RFU l^{-1} h^{-1}	RFU de Fluorescencia Rel. (gDM)$^{-1}$	RFU de Fluorescencia Rel (man/l)$^{-1}$
3	687.5	312.5	352.0
4	452.5	346.0	283.3
5	28.3	1.8	136.0
6	79.4	11.6	343.0

Estos resultados muestran claramente que la presente invención utilizando los plásmidos que llevan el promotor de manosa se pueden utilizar exitosamente en procesos de fermentación a alta densidad celular y expresión controlada positivamente por adición del inductor D-manosa.

Adicionalmente, al seleccionar el régimen de inducción, se puede variar el foco de la fermentación en la maximización de la producción en vista de la biomasa, el producto de expresión y el consumo de inductor , respectivamente, de acuerdo con la necesidad.

En vista de facilidad el régimen de inductor de procesamiento en dirección 3’ con la inducción de impacto combinado y carga exponencial de acuerdo con la serie 3 es particularmente ventajoso.

Aquí, el alto producto de expresión generado con respecto a la biomasa hace el procesamiento adicional, tal como las etapas de purificación, etc. más eficiente y, por lo tanto, se ahorra en tiempo costes.

REIVINDICACIONES

1. Vector que se puede expresar en una célula anfitriona procariótica que comprende un promotor inducible por manosa del operón de manosa de Bacillus subtilis ligado en forma funcional a una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un polipéptido, en donde el promotor inducible por manosa se selecciona del promotor manP y promotor manR.

2. Vector de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el vector comprende la secuencia parcial o completa del gen regulador manR.

3. Vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el promotor manP comprende una secuencia seleccionada de

SEQ ID NO. 1
tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60

tttcggtata cagttgagac aagatcttat tattcacact ttctagaaat aattttctta 120

agaaggagat atacatatga cac 143

y

SEQ ID NO. 2
tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60

tttcggtata cagttgagac 80,

y una secuencia complementaria las mismas o variantes de estas.

4. Vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor manR comprende una secuencia seleccionada de

SEQ ID NO. 3
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

ggtttcttat atagtatact tatactatca atttgctcaa gtagatactg acaggcttaa 180

gaaggagata tacat 195,

SEQ ID NO. 4.
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

ggtttctt 128

y

SEQ ID NO. 5
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

g 121,

una secuencia complementaria de las mismas o variantes de estas

5. Vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el vector comprende en dirección 5' de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga un elemento de respuesta a un catabolito.

6. Vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el vector comprende una secuencia de terminación de transcripción ubicada en dirección 3' de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga.

7. Vector de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la secuencia de terminación de transcripción se deriva de la región 3' del gen tufA de Bacillus subtilis.

8. Vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el vector es un vector lanzadera replicable en Escherichia coli y Bacillus subtilis.

9. Vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el vector comprende el origen de replicación de plásmido pUC18 y/o el replicón pBS72 o el gen rep junto con el origen de replicación del plásmido pUB110.

10. Vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo.

11. Vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región de iniciación de transcripción de gen manP o gen manR se reemplaza por la región de iniciación de transcripción de otro gen.

12. Vector de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la región de iniciación de transcripción del gen manP o gen manR se reemplaza por la región de iniciación de transcripción del gen tufA o gen gsiB.

13. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada de la región promotora inducible por manosa del operón de manosa del Bacillus subtilis, secuencia complementaria de esta o variantes de la misma, en donde el promotor inducible por manosa se selecciona del promotor manP y el promotor manR.

14. La secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la secuencia comprende cualquiera de

SEQ ID NO. 1
tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60

tttcggtata cagttgagac aagatcttat tattcacact ttctagaaat aattttctta 120

agaaggagat atacatatga cac 143,

SEQ ID NO. 2
tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60

tttcggtata cagttgagac 80,

SEQ ID NO. 3
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

ggtttcttat atagtatact tatactatca atttgctcaa gtagatactg acaggcttaa 180

gaaggagata tacat 195,

SEQ ID NO. 4.
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

ggtttctt 128

y

SEQ ID NO. 5
tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt 60

ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac 120

g 121,

secuencia complementaria de estas o variantes de las mismas.

15. Célula anfitriona procariótica transformada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o con una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 13 o 14.

16. Célula anfitriona procariótica de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona procariótica se somete a represión catabólica de carbono y comprende un sistema de fosfortransferasa para fosfoenolpiruvato: carbohidrato.

17. Célula anfitriona procariótica de acuerdo con reivindicaciones 15 o 16, en donde la célula anfitriona procariótica es Gram-positiva.

18. Célula anfitriona procariótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, en donde la célula anfitriona pertenece al phylum Firmicutes.

19. Método para producir un polipéptido en un célula anfitriona procariótica que comprende las etapas de construir un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, transformar un célula anfitriona procariótica con dicho vector, permitir la expresión de dicho polipéptido al hacer crecer la célula anfitriona transformada en un medio de cultivo celular bajo condiciones adecuadas y recuperar el polipéptido de las células o del cultivo celular.

20. Método de acuerdo con la reivindicación 19 en donde las células anfitrionas se hacen crecer primero en la presencia de una fuente de carbono diferente del inductor, y luego, en una segunda etapa, en la presencia del inductor.

21. Uso del vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de una secuencia de ácidos nucleicos aislada y purificada de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, para la expresión regulada de una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un polipéptido en una célula anfitriona procariótica.

```
TTTTATCTCA TTTGGATTAT TAAAAGCAGG GATTATTCCT TGCTTTTTTT
                manR                                  -35
GTTATAGGGA AAAATGCCTT TATTACCGGA ACCTATGGTA AAAAAAGCGA
                          -10        +1 BglII
TTTTAATGAG CTGATTTCGG TATACAGTTG AGACAAGATC TTATTATTCA
      XbaI              AflII              NdeI
CACTTTCTAG AAATAATTTT CTTAAGAAGG AGATATACAT ATGACACATG
                                                Lyso_Bs
```

Fig. 1

```
pSUN291                    pSUN384.1            pSUN385.2
TGAATTTCTG CTGAATATAC ATTACATAGC AAACTCAAAG AGTATAAAAA

            pSUN386.9 HindIII                -35
TCGCTTTTTT CCGGAAGCTT CGGTAAAAAA CGAAACTTTT GTCTCTATGA

        PsiI  -10          +1
TTTTGTTTTA TAATGTAAAC GGTTTCTTAT ATAGTATACT TATACTATCA
                  >>...CRE..>>

                                AflII              NdeI
ATTTGCTCAA GTAGATACTG ACAGGCTTAA GAAGGAGATA TACATATGAC
                                                >lacZ
```

Fig. 2

```
        HindIII                    -35
TTTTTCCGGA AGCTTCGGTA AAAAACGAAA CTTTTGTCTC TATGATTTTG
    -10    CRE    +1
TTTTATAATGTAAACGGTTT CTTATATAGT ATACTTATAC TATCAATTTG

CTCAAGTAGA TACTGACAGG AAGGATAGAA AAACAGATGG AATACATAAA
                                         manR
```

Fig. 3

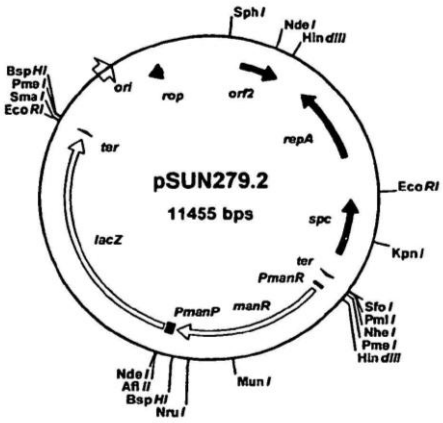

Sph I
Nde I
Hin dIII
Bsp HI
Pme I
Sma I
Eco RI
ori
rop
orf2
repA
ter
pSUN279.2
11455 bps
EcoRI
spc
lacZ
Kpn I
ter
PmanR
PmanP
manR
Sfo I
Pml I
Nhe I
Pme I
Hin dIII
Nde I
Afl II
Bsp HI
Nru I
Mun I

Fig. 4

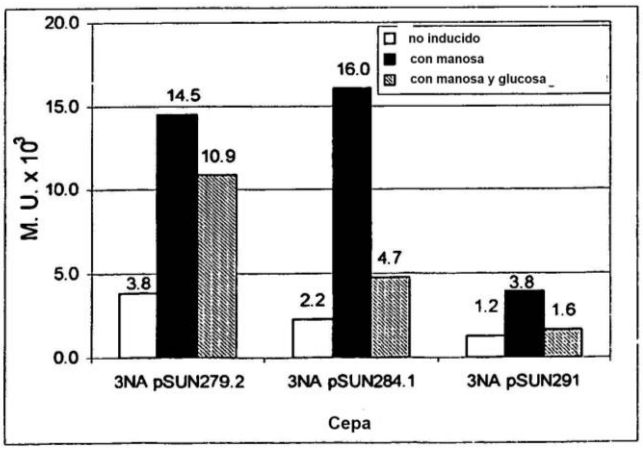

20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
M. U. x 10³
no inducido
con manosa
con manosa y glucosa
3.8
14.5
10.9
2.2
16.0
4.7
1.2
3.8
1.6
3NA pSUN279.2
3NA pSUN284.1
3NA pSUN291
Cepa

Fig. 5

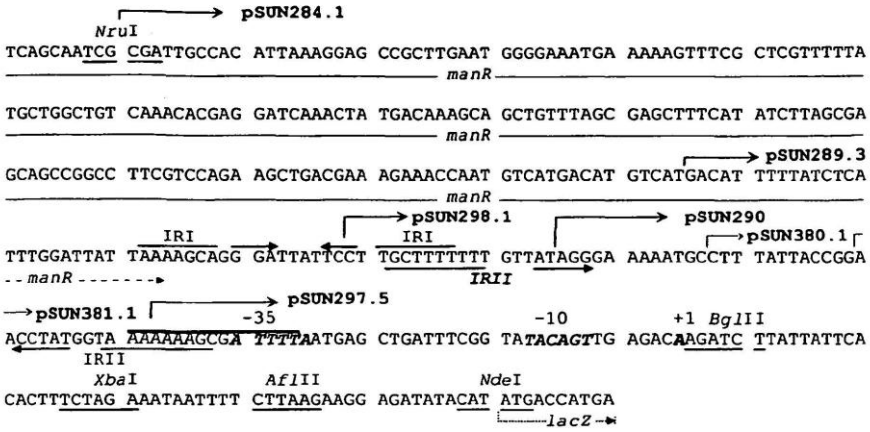

pSUN284.1
NruI
TCAGCAATCG CGATTGCCAC ATTAAAGGAG CCGCTTGAAT GGGGAAATGA AAAAGTTTCG CTCGTTTTTA
manR
TGCTGGCTGT CAAACACGAG GATCAAACTA TGACAAAGCA GCTGTTTAGC GAGCTTTCAT ATCTTAGCGA
manR
pSUN289.3
GCAGCCGGCC TTCGTCCAGA AGCTGACGAA AGAAACCAAT GTCATGACAT GTCATGACAT TTTTATCTCA
manR
pSUN298.1
pSUN290
IRI
IRI
pSUN380.1
TTTGGATTAT TAAAAGCAGG GATTATTCCT TGCTTTTTTT GTTATAGGGA AAAATGCCTT TATTACCGGA
manR
IRII
pSUN297.5
pSUN381.1
-35
-10
+1 BglII
ACCTATGGTA AAAAAAGCGA TTTTAATGAG CTGATTTCGG TATACAGTTG AGACAAGATC TTATTATTCA
IRII
XbaI
AflII
NdeI
CACTTTCTAG AAATAATTTT CTTAAGAAGG AGATATACAT ATGACCATGA
lacZ

Fig. 6

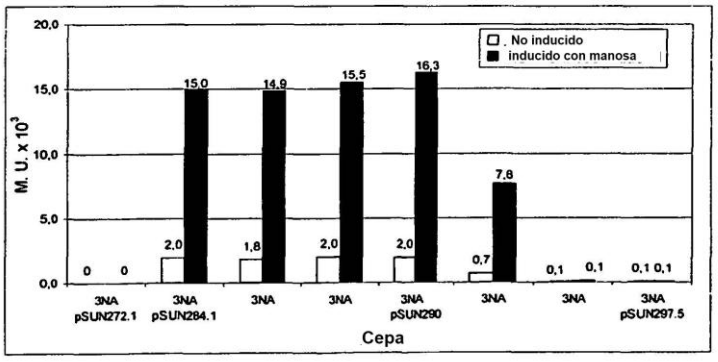

No inducido
inducido con manosa
M. U. x 10³
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0
0
2,0
15,0
1,8
14,9
2,0
15,5
2,0
16,3
0,7
7,6
0,1
0,1
0,1
0,1
3NA pSUN272.1
3NA pSUN284.1
3NA
3NA
3NA pSUN290
3NA
3NA
3NA pSUN297.5
Cepa

Fig. 7

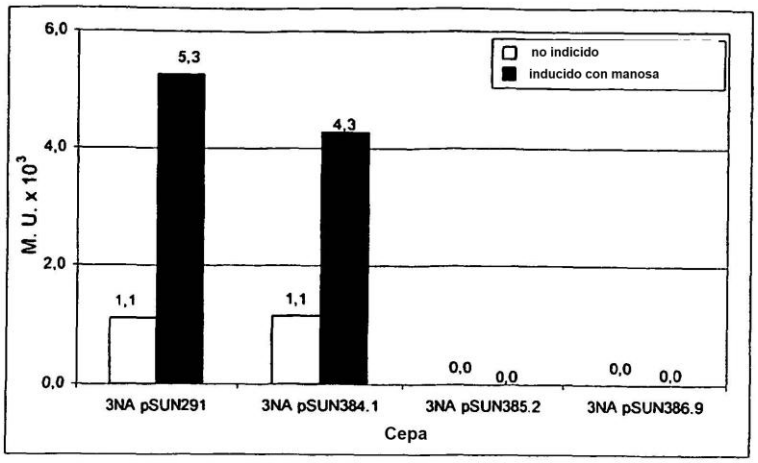


Fig. 8

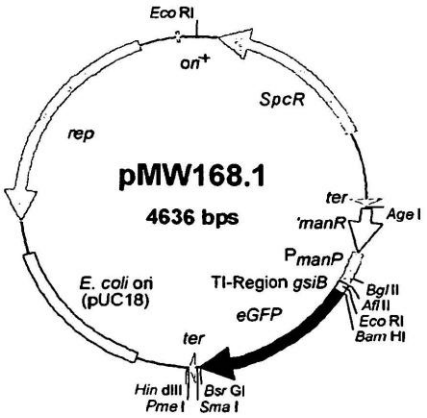


Fig. 9: mapa de plásmido pMW 168.1

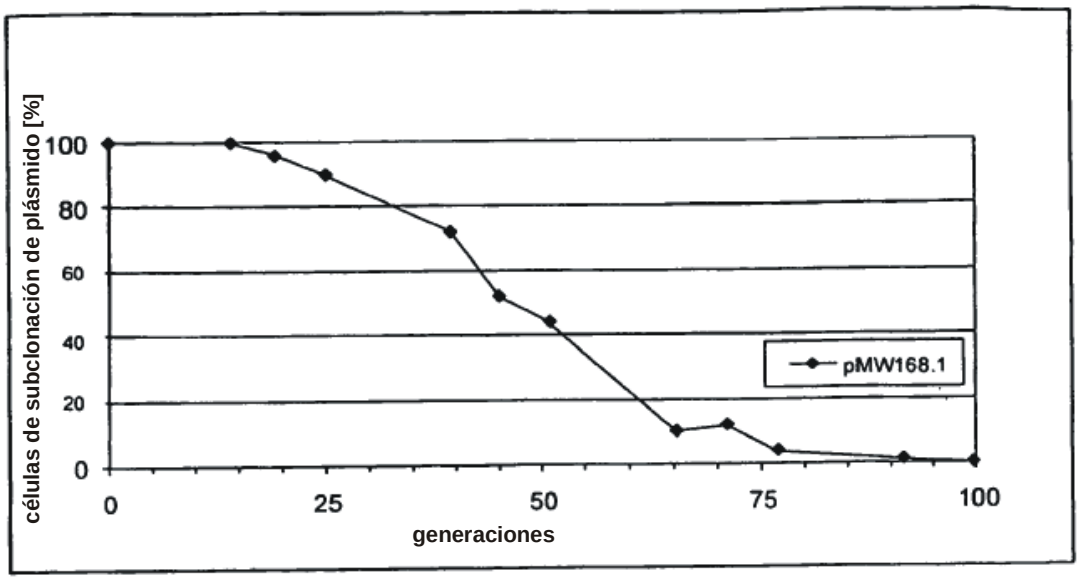


Fig. 10: **prueba de estabilidad de plásmido de pMW 168.01 en *B. Subtilis* 3NA**

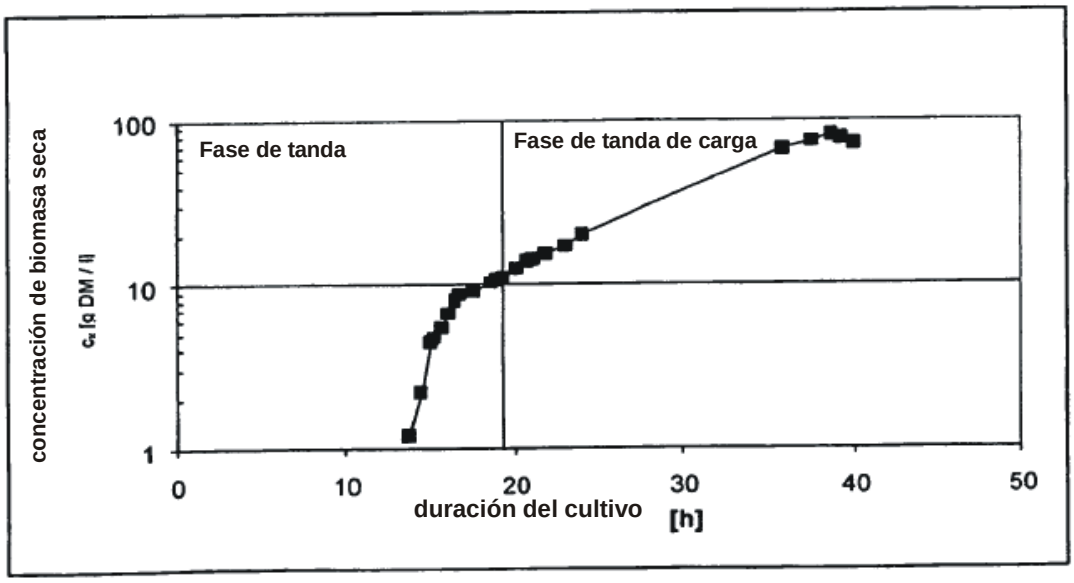


Fig. 11a:**progreso de crecimiento de serie 1**

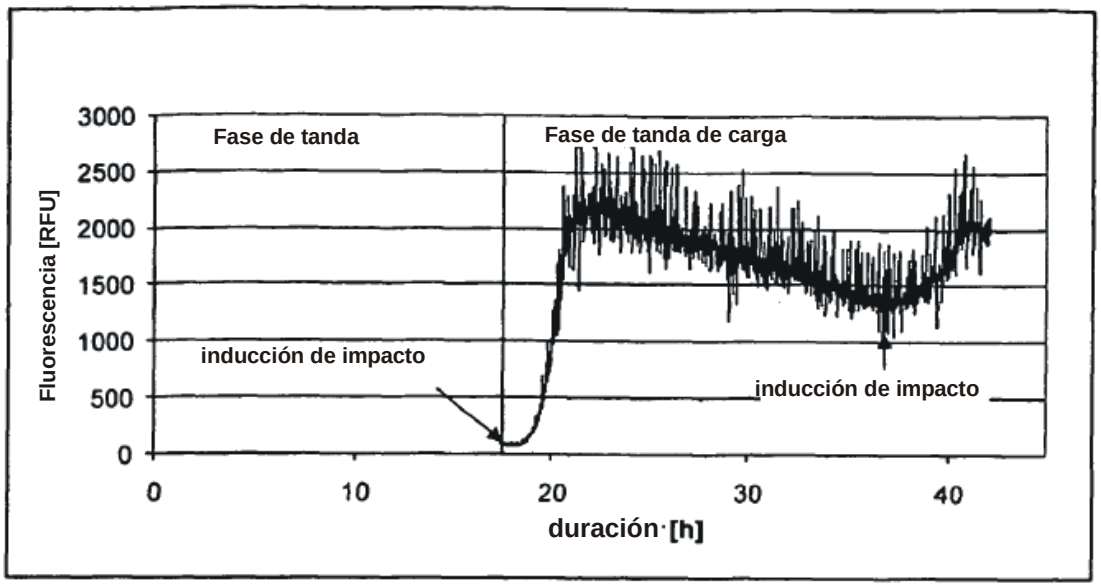


Fig. 11b: señal de fluorescencia de serie 1

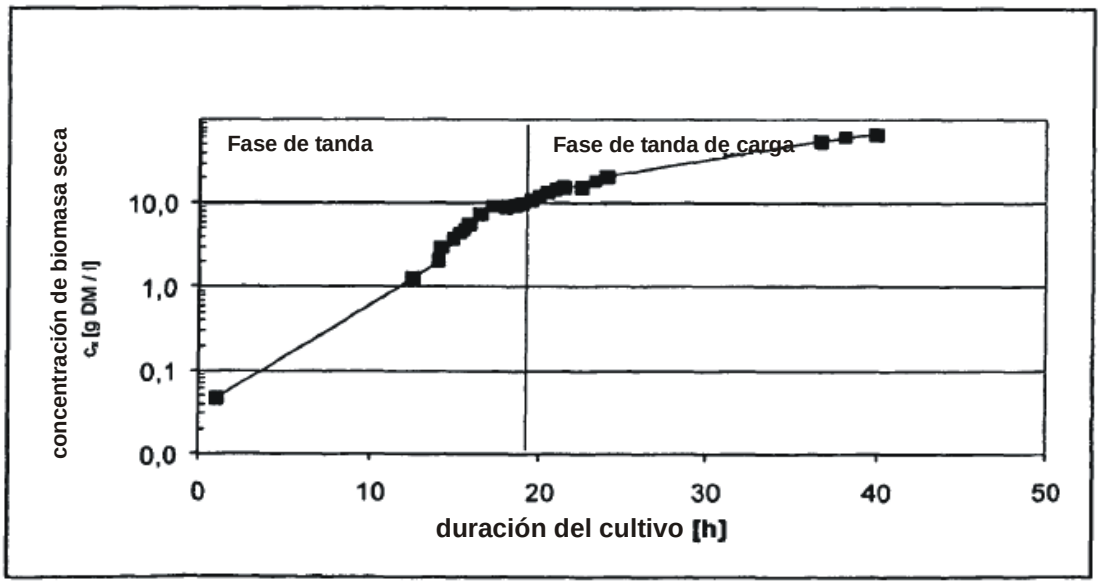


Fig. 12a: progreso de crecimiento de serie 2

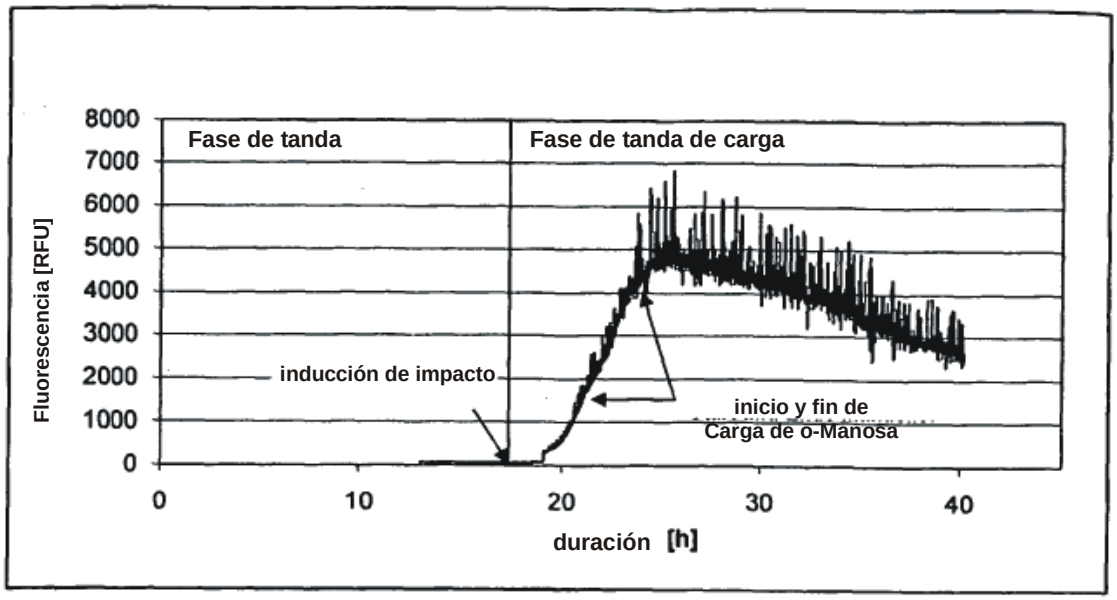


Fig. 12b: señal de fluorescencia de serie 2

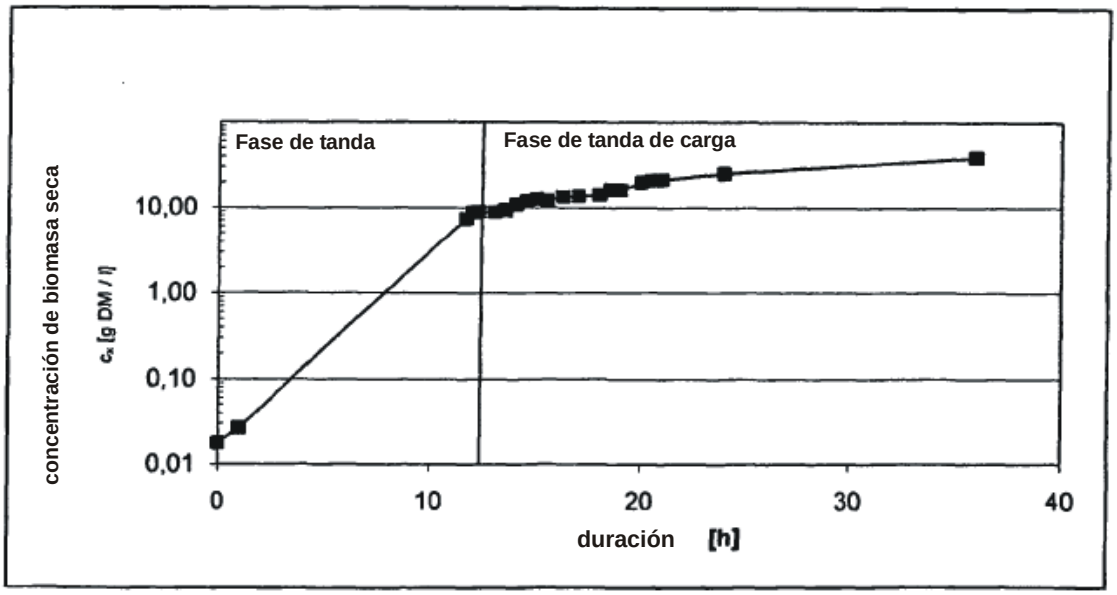


Fig. 13a: progreso de crecimiento de serie 3

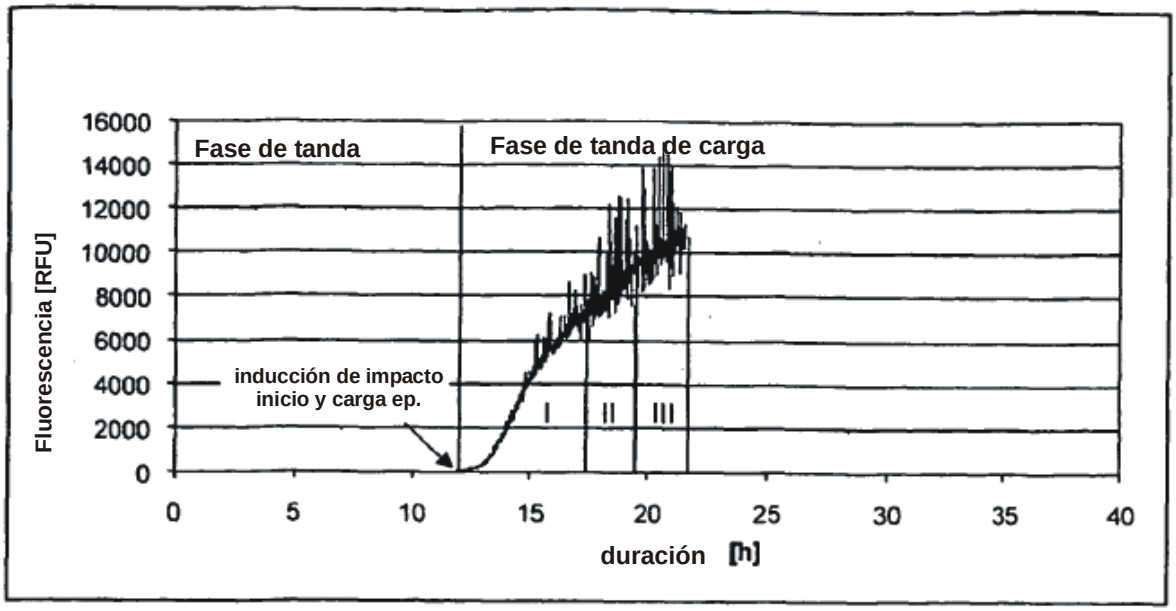


Fig. 13b: señal de fluorescencia de serie 3

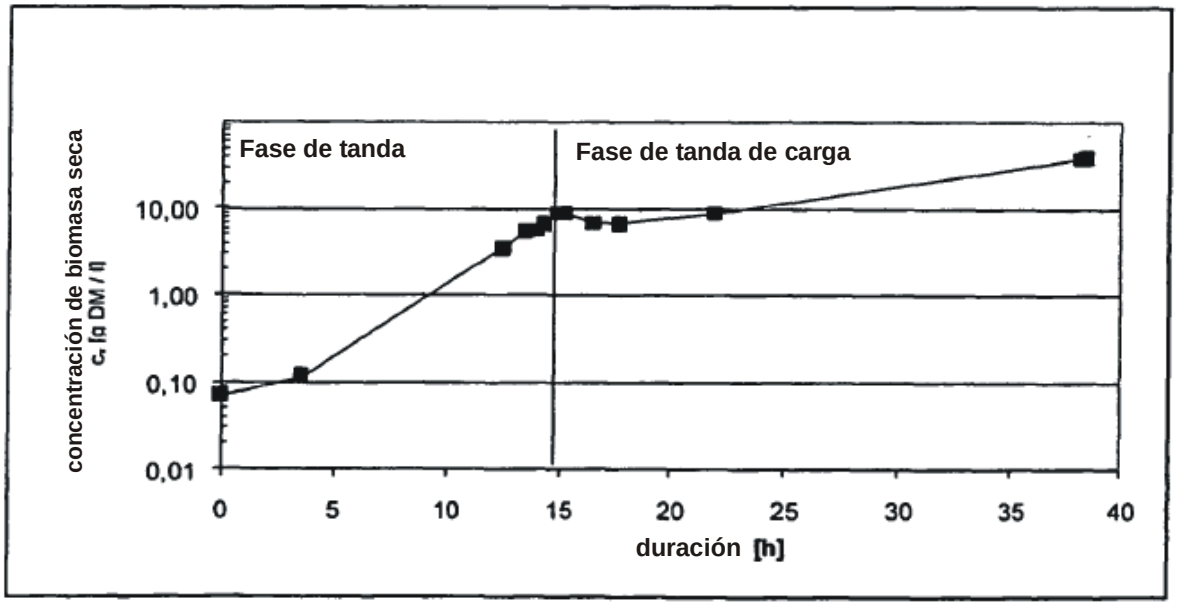


Fig.14a: progreso de crecimiento de serie 4

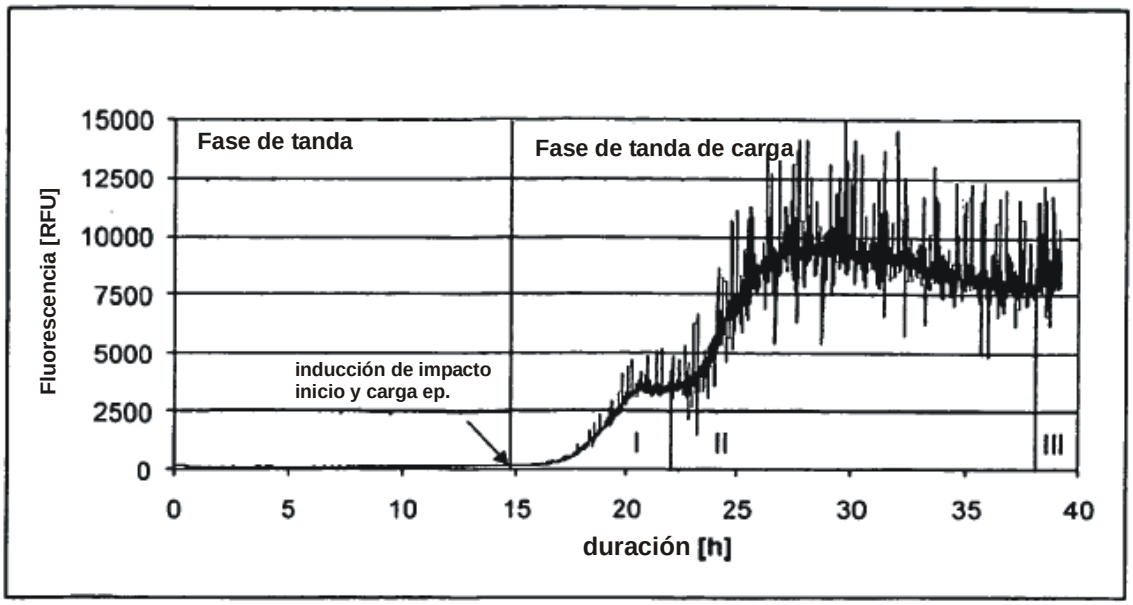


Fig. 14b: señal de fluorescencia de serie 4

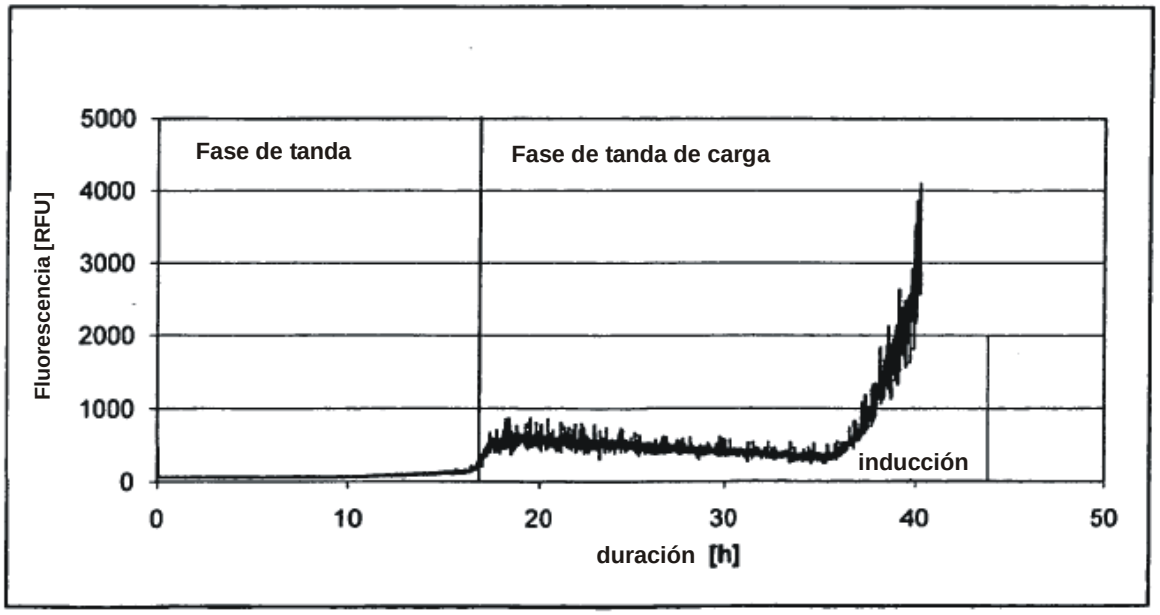
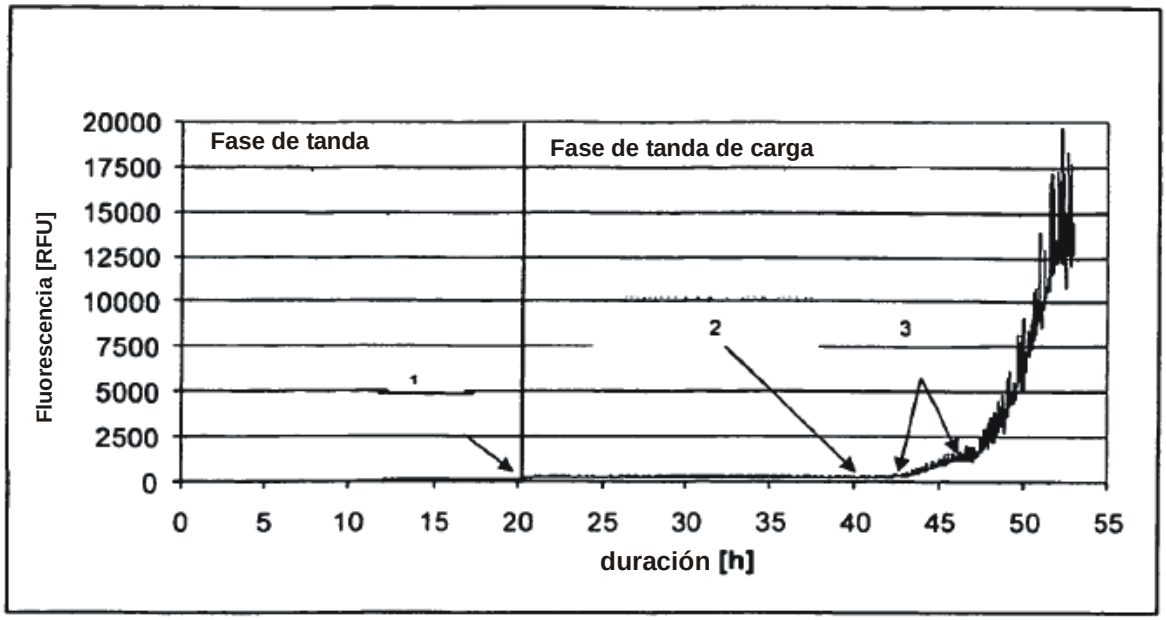


Fig. 15: progreso de crecimiento de serie 5



[1: inicio de carga de glucosa
2: inducción de impacto D-manosa y
fin de la carga de glucosa
3: carga constante de D-manosa]

Fig. 16: progreso de crecimiento de serie 6