

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 933**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2003 E 03796327 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1545217**

54 Título: **Inducción de la expresión génica utilizando una mezcla de azúcares a alta concentración**

30 Prioridad:

10.09.2002 US 409466 P

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

22.05.2013

73 Titular/es:

**GENENCOR INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**ENGLAND, GEORGE;
KELLEY, AARON y
MITCHINSON, COLIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 403 933 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

Inducción de la expresión génica utilizando una mezcla de azúcares a alta concentración

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas.

5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud Provisional de EE.UU. n° 60/409.466, presentada el 10 de septiembre 2002 (Expediente N° GC774P).

Declaración sobre los derechos de invenciones realizadas bajo investigación y desarrollo de subvención federal.

10 Partes de este trabajo fueron financiadas por el Subcontrato No. ZCO-0-30017-01 con el Laboratorio Nacional de Energía Renovable bajo el Contrato Principal N° DE-AC36-99G010337 con el Departamento de Energía de los EE.UU. En consecuencia, el Gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en esta invención.

Campo de la invención

15 Esta invención se refiere a métodos para mejorar la producción de proteínas a partir de un cultivo de células. Los inventores han descubierto componentes y condiciones de cultivo que hacen aumentar drásticamente la cantidad de proteína producida a partir de genes bajo el control de secuencias promotoras de genes de celulasa. Los métodos mejorados se pueden utilizar para la producción de proteínas codificadas por genes de celulasa de origen natural, así como de diversas construcciones heterólogas.

Fundamento de la invención

20 Los hongos filamentosos y las bacterias celulolíticas producen enzimas de celulasa extracelular que confieren a los organismos la facultad de hidrolizar los enlaces glicosídicos ligados β -(1, 4) de la celulosa para producir glucosa. Estas enzimas proporcionan a los organismos la facultad de usar para el crecimiento celulosa, el polisacárido vegetal más abundante.

El hongo filamentoso, *Trichoderma reesei*, es un eficaz productor de enzimas de celulasa. Como tal, *Trichoderma reesei* ha sido explotado por su facultad de producir estas enzimas, que son valiosas en la preparación de productos tales como etanol combustible, ropa, detergentes, fibras y otros productos.

25 La mezcla celulolítica de proteínas de *Trichoderma reesei* está entre las rutas celulolíticas de microorganismos mejor caracterizadas. Las celulasas que comprenden estas mezclas se clasifican en dos amplias categorías: las endoglucanasas (EG) y las celobiohidrolasas (CBH). La β -glucosidasa es parte también de la mezcla de celulasas de *Trichoderma reesei*.

30 El *Trichoderma reesei* ha sido explotado también por su capacidad para producir proteínas heterólogas. Los genes que codifican una proteína deseada pueden ser regulados cuando están unidos operativamente al promotor *cbh1* inducible de *T. reesei*. Polipéptidos extraños han sido segregados en *Trichoderma reesei* como fusiones con el dominio catalítico más la región del enlazador de *cbh 1* (Nyyssonen et al., Bio/technology 11 : 591-595, 1993).

35 La expresión de los genes que comprenden el sistema de celulasa está coordinada y regulada a nivel de la transcripción. Los miembros de este sistema actúan sinérgicamente y, como se indicó anteriormente, son necesarios para la eficiente hidrólisis de la celulosa para dar oligosacáridos solubles.

40 La expresión y la producción de los principales genes de la celulasa en *Trichoderma*, *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*, depende de la fuente de carbono disponible para el crecimiento. Los genes de celulasa son reprimidos fuertemente por la glucosa y son inducidos varios miles de veces por celulosa o el disacárido soforosa. Desde luego, el nivel de expresión de la principal celobiohidrolasa 1 (*cbh1*) es regulado por exceso varios miles de veces en medios que contienen fuentes de carbono inductoras tales como celulosa o soforosa, en comparación con medios que contienen glucosa (Ilmen et al., App. Environ. Microbio., 1298-1306, 1997).

45 La producción en escala comercial de enzimas de celulasa se hace mediante cultivo sólido o bien en cultivo sumergido, incluyendo procesos por cargas, de tanda alimentada, o de flujo continuo. El aspecto más problemático y costoso de la producción industrial de celulasa es proporcionar el inductor apropiado a *Trichoderma*. Como sucede con los experimentos a escala de laboratorio, la producción de celulasa en una escala comercial se induce desarrollando el hongo sobre la celulosa sólida o cultivando el organismo en presencia de un inductor de disacárido tal como la lactosa. Desgraciadamente, en una escala industrial los dos métodos de inducción presentan inconvenientes que tienen por resultado costes elevados que están asociados con la producción de celulasa.

50 La síntesis de celulasa está sujeta tanto a la inducción de la celulosa como a la represión de la glucosa. Así pues, un factor crítico que influye en el rendimiento de las enzimas de celulasa o de proteínas heterólogas bajo el control de un promotor inducible es el mantenimiento de un equilibrio adecuado entre el sustrato de celulosa y la concentración de glucosa; es crítico para obtener rendimientos comerciales razonables del producto del gen regulado. Aunque la celulosa es un inductor eficaz y barato, puede ser problemático el control de la concentración de glucosa cuando se

cultiva el *Trichoderma* en celulosa sólida. A bajas concentraciones de celulosa, la producción de glucosa puede ser demasiado lenta para satisfacer las necesidades metabólicas del crecimiento celular activo y la función. Por otro lado, la síntesis de celulasa puede detenerse por la represión de glucosa cuando la formación de glucosa es más rápida que el consumo. Así pues, se requieren costosos sistemas de control de procesos para proporcionar la adición lenta del sustrato y la monitorización o vigilancia de la concentración de glucosa (Ju y Afolabi, *Biotechnol. Prog.*, 91 - 97, 1999). Por otra parte, puede ser difícil de lograr el suministro lento y continuo de sustrato como consecuencia de la naturaleza sólida de los materiales celulósicos.

Allen y Mortensen (*Biotechnol. Bioeng.*, 2641-45, 1981) han señalado que 200 UI /ml de β -glucosidasa purificada de *Aspergillus phoenicis* cuando se incuban con un jarabe de glucosa al 50%, producen una solución con la capacidad de inducir la producción de celulasa cuando se usa como fuente de carbono. La purificación de la β -glucosidasa es a la vez laboriosa y cara. Además, estos autores utilizaron más de 20 veces la carga de β -glucosidasa en comparación con la utilizada en el presente trabajo.

Algunos de los problemas asociados con el uso de la celulosa como sustrato inductor pueden ser superados mediante el uso de sustratos e inductores solubles tales como la lactosa o la soforosa. La lactosa tiene que ser proporcionada en concentraciones altas para que funcione como inductor y fuente de carbono (véase Seiboth, et. Al., *Mol. Genet. Genomics*, 124-32, 2002). La gentiobiosa puede servir también como inductor. La soforosa es un inductor más potente que la celulosa, pero la soforosa es cara y difícil de elaborar. Así, aunque es más fácil de manejar y controlar que la celulosa sólida, sin embargo la soforosa puede hacer el coste de producción de celulasas prohibitivamente caro y, por lo tanto, no es práctica para la producción de celulasa comercial. Toussaint et al.; *Biotechnology Letters*, vol. 12, n° 8, 1990, páginas 587-592, describe reacciones de reversión que tienen lugar con el sistema *Trichoderma reesei* CL-847. No se han descrito reacciones usando soluciones de glucosa pura. Claramente, existe la necesidad de una composición conveniente de sustrato soluble que también proporcione un método económico de inducción de celulasa en hongos filamentosos, por ejemplo, en *Trichoderma reesei*.

Además, la capacidad para regular los promotores inducibles para expresar bien sea genes endógenos o bien heterólogos con un agente inductor económico, supondría un gran beneficio comercial.

Breve resumen de la invención

Se ha descubierto ahora que cuando se añade un preparado de celulasa completa a una solución de glucosa concentrada, y la composición se incuba durante al menos dos días a una temperatura de 50°C a aproximadamente 65°C, se produce una mezcla de azúcares que contiene cantidades apreciables de un inductor de la expresión del gen de la celulasa. Sorprendentemente, la mezcla compleja resultante es suficiente para inducir la producción de celulasa tal cual, sin más purificación. Este descubrimiento es sorprendente ya que glucosa actúa como un represor de los genes de la celulasa en *Trichoderma reesei*. Este descubrimiento proporciona un inductor de la expresión del gen de la celulasa que es una alternativa barata a la lactosa o a la soforosa purificada, y una alternativa menos fastidiosa a la celulosa sólida para la producción de celulasas en *Trichoderma reesei*.

En el presente texto se describe una composición para la inducción de la expresión de genes cuya expresión está bajo el control de las secuencias promotoras del gen de celulasa, que comprende: (i) de aproximadamente 5% a aproximadamente 75% (peso/peso) de glucosa, preferentemente de 50% a 70% de glucosa y (ii) de aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 10 g/L de proteína total, preferentemente 5 g/L de preparado de celulasa completa, en donde la composición se incuba a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C durante varios días antes de usarla para favorecer la formación dentro de la composición de un inductor de la expresión génica.

En otra realización, la composición de alimentación inductora se incuba a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, preferentemente de aproximadamente 55°C, durante 48 horas antes del uso.

En otra realización, la composición de la alimentación inductora se incuba a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, preferentemente a aproximadamente 65 °C, durante 72 horas antes de su uso.

En una realización preferida, el producto de incubación que resulta de la incubación de una solución de glucosa concentrada con el preparado de celulasa completa, es una mezcla de azúcares que contienen soforosa. En otra realización preferida, el producto de incubación es una mezcla de azúcares que contiene gentiobiosa.

En una realización, la invención proporciona un método para producir proteínas cuya expresión génica está bajo el control de una secuencia promotora inducible, en el que se proporciona un cultivo de células, y se añade al cultivo una composición de alimentación inductora que resulta de la incubación de un preparado de celulasa completa, en una solución concentrada de glucosa en una cantidad eficaz para inducir la expresión de los genes bajo el control de la secuencia promotora inducible, como se define en las reivindicaciones.

Los métodos mejorados pueden usarse para la producción de proteínas codificadas por genes de celulasa de origen natural, así como de diversas construcciones heterólogas. Tales construcciones incluyen vectores de expresión en los que el gen que codifica la proteína de interés está unido operativamente a un promotor inducible. En una realización, el promotor inducible es un promotor del gen de la celulasa. En una segunda realización, el promotor inducible

es un promotor inducible por soforosa. En una tercera realización, el promotor inducible es un promotor inducible por gentiobiosa. En un aspecto, el promotor inducible es un promotor *cbh 1*.

5 En una realización, el método para producir una proteína de interés produce una proteína seleccionada del grupo formado por hormonas, enzimas, factores de crecimiento, citocinas y anticuerpos. En un aspecto, el método se usa para producir proteínas que son enzimas de celulasa naturales. En otro aspecto, el método se utiliza para producir proteínas cuya expresión no está de forma natural bajo el control de secuencias promotoras del gen de la celulasa.

En otra realización, el método para producir proteínas emplea un hongo filamentoso. En un aspecto, el hongo es *Trichoderma*. En otro aspecto, el hongo es *Trichoderma reesei*.

10 En una realización más, el método para producir una proteína de interés utiliza una composición inductora producida añadiendo un preparado de celulasa completa a una solución de celobiosa, y la disolución de celulasa y celobiosa se incuba durante al menos dos días a una temperatura de 50 °C a aproximadamente 70 °C para formar una composición de alimentación inductora. En un aspecto, la solución se incuba durante al menos dos días a una temperatura de 50°C a aproximadamente 65 °C para formar una composición de alimentación inductora. Esta composición es una mezcla de azúcares que contiene cantidades apreciables de un inductor de la expresión del gen de la celulasa.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra los efectos sobre la producción de celulasa de *T. reesei* (RLP-37) (véase Sheir-Neiss y Montencourt, Appl. Microbio. Biotechnol., 46-53, 1984) del tipo silvestre, de la alimentación de la composición inductora de la invención (■; cuadrados) en comparación con una composición de glucosa (◆; rombos).

20 La figura 2 es un gráfico que ilustra las diferencias entre la producción de soforosa por enzima inmovilizada (■; cuadrados) en comparación con una solución de enzima (◆; rombos). La concentración final de glucosa es aproximadamente del 40%. La carga de proteína era 10 g / L. Véase el ejemplo 4 para más detalles.

25 La figura 3 es un gráfico que ilustra las diferencias entre la producción de soforosa por enzima inmovilizada (■; cuadrados) en comparación con una solución de enzima (▲; triángulos). La concentración final de glucosa es aproximadamente del 60%. La carga de proteína era de 3,2 g / L. Véase el ejemplo 4 para más detalles.

30 La figura 4 es un gráfico que compara los resultados de una segunda ejecución de experimentos con la primera ejecución de experimentos descritos para las figuras 2 y 3 que usaron la misma enzima inmovilizada. La enzima inmovilizada recuperada después de la primera realización retuvo la actividad en la segunda ejecución. Los símbolos son: ■ (cuadrados), primera ejecución del experimento de 10 g / L; ◆ (rombos), segunda ejecución del experimento de 10 g / L; ▲ (triángulos), primera ejecución del experimento de 3,2 g / L; X, segunda ejecución del experimento de 3,2 g / L.

La figura 5 es un gráfico que muestra la producción de soforosa en celobiosa al 25% en comparación con glucosa al 25%. Producción de soforosa en solución de celobiosa al 25% (■; cuadrados) o de glucosa (p / p) (●; círculos).

35 La figura 6 es un gráfico que muestra la producción de soforosa en solución de glucosa al 60% (p / p) a diferentes cargas de celulasa completa. ▲ (triángulos), 2,5 g / L, ■ (cuadrados), 5,0 g / L, ◆ (rombos), 7,5 g / L, X, 10 g / L de celulasa completa.

Descripción detallada

40 El hongo filamentoso *Trichoderma reesei* es uno de los organismos celulolíticos más ampliamente estudiados (revisado, por ejemplo, por Nevalainen y Penttila, Mycota, 303-319, 1995). En la industria, las enzimas celulolíticas de *Trichoderma* se utilizan para muchos fines entre los que se incluyen la producción de etanol combustible, papel, rayón, celofán, detergentes y fibras. Las enzimas de celulasa se utilizan también para mejorar el valor nutricional de alimentos para animales, y para facilitar la extracción de componentes valiosos a partir de células vegetales (Mandels, Biochem. Soc. Trans., 414-16, 1985). Así pues, estas enzimas son de importancia primaria en la obtención de muchos productos útiles.

45 La producción de celulasas en *Trichoderma* depende de la fuente de carbono disponible. La celulosa, la lactosa y el disacárido soforosa, inducen la síntesis de celulasa por *Trichoderma reesei*. En cambio, la presencia de glucosa tiene por resultado la represión estricta de la expresión del gen de la celulasa. Proporcionar el inductor apropiado para la producción un escala industrial es un importante factor problemático que contribuye a los altos costes de producción de las enzimas de celulasa.

50 Se ha descubierto ahora que cuando se añade un preparado de celulasa completa a una solución concentrada de glucosa, y se incuba la composición durante al menos dos días a una temperatura entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 75 °C, preferentemente alrededor de 50 °C a 65 °C, se hace una mezcla de azúcares que contiene cantidades apreciables de un inductor de la expresión del gen de celulasa, es decir, la composición de la alimentación inductora. La composición de alimentación inductora tiene entre aproximadamente 2 y 25 g/L de soforosa.

Además, la composición de alimentación inductora tiene entre aproximadamente 35 y 60 g/L de gentiobiosa. Sorprendentemente, la mezcla resultante no necesita ninguna purificación posterior. Es competente para inducir la producción de celulasa tal cual está. Este descubrimiento proporciona una alternativa económica a la lactosa o soforosa purificada que necesita la industria, así como una alternativa a la celulosa sólida menos engorrosa, para la producción de proteínas reguladas por promotores inducibles en un hongo filamentoso. Se contempla específicamente que la composición de la invención es útil para la producción de celulasa en *Trichoderma*.

En un método alternativo para la producción de la composición de la alimentación inductora, el caldo de fermentación final (celulasa completa más las células) puede ser añadido a una solución de glucosa (por ejemplo, 20%). La presencia de las células no afecta a la formación de soforosa. Así pues, no es necesario usar una celulasa recuperada (es decir, un preparado de celulasa aislado de las células). Se puede usar la mezcla de enzimas presentes al final de la fermentación aunque las células todavía estén presentes.

Se describe en el presente texto una composición que comprende una solución concentrada de glucosa y un preparado de celulasa completa que puede ser usada como alimento inductor para la producción de una proteína de interés por un hongo filamentoso. En un aspecto, la proteína de interés es una enzima celulolítica. En otro aspecto, la proteína de interés es una proteína heteróloga. En una realización el alimento inductor induce la producción de enzima celulasa por el *Trichoderma reesei*. Es sorprendente que la solución es efectiva en la inducción de la expresión del gen de la celulasa, ya que se sabe que los genes de celulasa son reprimidos por la presencia de glucosa.

En una realización, se hace un alimento inductor mediante la preparación de una solución estéril de 5% a 75% (peso/peso) de glucosa. Se añade un preparado de celulasa completa de *Trichoderma reesei* a una solución estéril de glucosa a una concentración final entre 2 g y 20 g de proteína total / L. El margen de la proteína final puede ser tan bajo como 0,5 g / L y tan alto como 50 g / L. En un aspecto, la actividad de β -glucosidasa en la solución de glucosa es mayor que 1,5 UI/ml. En un aspecto, la actividad de β -glucosidasa en la solución de glucosa está entre 1,5 UI/ml y 200 UI/ml. En otro aspecto la actividad de la β -glucosidasa de la solución de glucosa está entre 1,9 UI/ml y 200 UI/ml. En otro aspecto la actividad de la β -glucosidasa de la solución de glucosa está entre 9,3 UI/ml y 200 UI/ml. En otro aspecto la actividad de la β -glucosidasa de la solución de glucosa está entre 1,5 UI/ml y 180 UI/ml. En otro aspecto la actividad de la β -glucosidasa de la solución de glucosa está entre 9,3 UI / ml y 180 UI/ml. La solución se incuba a una temperatura entre 50 °C y 75 °C, preferentemente entre 50 °C y 65 °C. La solución se incuba durante un tiempo entre 8 horas y 7 días, con agitación. En una realización, el período de incubación es superior a dos días. En una segunda realización el período de incubación es de dos días. En una tercera realización el período de incubación es de tres días. La solución estéril final se recolecta y se utiliza para la alimentación de la fermentación. En una realización, el alimento inductor se prepara con una solución de glucosa al 60% (peso/peso). En otra realización, el alimento inductor se prepara añadiendo el preparado de celulasa completa a la solución de glucosa a una concentración final de 2 g de proteína total/L.

Otro objeto descrito en el presente texto es proporcionar la expresión y la secreción, por el hongo filamentoso hospedador, de las proteínas heterólogas deseadas a dicho hongo filamentoso huésped. Las proteínas producidas por la inducción de genes cuya expresión está controlada por una secuencia promotora inducible, incluyen proteínas de celulasa de origen natural, así como varias proteínas heterólogas. En una realización preferida, la proteína expresada bajo el control de secuencias promotoras inducibles es una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, o un anticuerpo.

Pueden utilizarse diversas especies de hongos filamentosos como huéspedes de expresión, incluyendo los géneros siguientes: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus* y *Pyricularia*. Los hospedadores de expresión específicos incluyen *Trichoderma reesei*, p. ej. NRRL 15709, ATCC 13631, 56764, 56765, 56466, 56767, *Trichoderma viride*, p. ej. ATCC 32098 y 32086, *Aspergillus nidulans*, (Yelton, M., et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU., 81, 1470-1474; Mullaney, E. J. et al (1985) Mol. Gen. Genet 199, 37-45; John, M. A. y Peberdy J. F. (1984) Enzyme Microb Technol 6, 386-389; Tilburn, et al (1982) Gene 26, 205-221; Ballance, D. J. et al. (1983) Biochem Biophys Res Comm 112, 284-289; Johnston, I. L et al . (1985) EMBO J. 4, 1307-1311) *A niger*, (Kelly, J. M. y M. Hynes (1985) EMBO 4, 475-479) *Aspergillus awamori*, p. ej. NRRL 3112, ATCC 22342, ATCC 44733, ATCC 14331 y la cepa UVK 143f, *Aspergillus oryzae*, p. ej. ATCC 11490, y *Neurospora crassa* (Case, M. E. et al (1979) Proc. Natl. Acad. Scie. EE.UU., 76, 5259-5263; Lambowitz patente de EE.UU. N ° 4.486.553; Kinsey, J. A. y J. A. Rambosek (1984) Molecular and Cellular Biology 4, 117-122; Bull, J. H. y J. C. Wooton (1984) Nature 310, 701-704).

En una realización preferida, el hospedador microbiano es un miembro de las especies de *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Bacillus* o *Cellulomonas*.

I. Definiciones

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que específicamente se une y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon, y mu, así como los miles de genes de inmunoglobulina de la región variable. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cade-

nas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión con el antígeno de un anticuerpo o su equivalente funcional será la más crítica en especificidad y afinidad de unión. Véase Paul, *Fundamental Immunology*.

5 Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50 - 70 kD). El término N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera
10 y pesada, respectivamente.

"Celulasa", "enzimas celulolíticas" o "enzimas de celulasa" significan exoglucanasas o exocelobiohidrolasas bacterianas o fúngicas, y/o endoglucanasas, y/o β -glucosidasas. Estos tres diferentes tipos de enzimas de celulasa actúan sinérgicamente para convertir la celulosa y sus derivados en glucosa.

15 Muchos microbios producen enzimas que hidrolizan la celulosa, incluyendo el hongo de descomposición de la madera *Trichoderma*, las bacterias del compost *Thermomonospora* (ahora *Thermobifida*), *Bacillus* y *Cellulomonas*; *Streptomyces*, y los hongos *Humicola*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Las enzimas hechas por estos microbios son mezclas de proteínas con tres tipos de acciones útiles en la conversión de la celulosa en glucosa: endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH), y beta-glucosidasa (BG).

20 Como se usa en el presente texto, las expresiones "preparado de celulasa completa" y "composición de celulasa completa" se usan indistintamente y se refieren a composiciones de origen tanto natural como no natural. Una composición "de origen natural" es una composición producida por una fuente de origen natural y que comprende uno o más componentes del tipo de celobiohidrolasa, uno o más del tipo de endoglucanasa, y uno o más del tipo de β -glucosidasa, en donde cada uno de estos componentes se encuentra en la proporción producida por la fuente. Una composición de origen natural es una que es producida por un organismo no modificado con respecto a las enzimas
25 celulolíticas de forma que la relación de las enzimas del componente es inalterada a partir de la producida por el organismo nativo u original.

Una composición "no natural" incluye las composiciones producidas: (1) combinando componentes de enzimas celulolíticas, bien sea en una relación natural o una no natural, es decir, alterada; o (2) modificando un organismo para que sobreexpresa o subexpresa una o más enzimas celulolíticas; o (3) modificando un organismo de forma que se
30 borre al menos una enzima celulolítica.

Las mezclas de celulasa completa útiles en la presente invención pueden tener borradas una o más de las diversas EGs y/o CBHs. Por ejemplo, la EG1 puede ser borrada sola o en combinación con otras EGs y/o CBHs. Las BGs pueden ser sobre-expresadas con relación a los niveles originales. La expresión heteróloga de BGs se contempla también en el presente texto.

35 "Limitación de carbono" es un estado en el que un microorganismo tiene justamente el carbono suficiente para producir un producto de proteína deseado, pero no suficiente carbono para satisfacer completamente los requerimientos del organismo, por ejemplo, mantener el crecimiento. Por consiguiente, la máxima cantidad de carbono va a la producción de proteínas.

40 Como se usa en el presente texto, los términos "promotor" y "promotor de celulasa" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona dirigiendo la transcripción de un gen secuencia abajo, y se utilizan indistintamente en el presente texto. El promotor será generalmente apropiado para la célula hospedadora en la que se expresa el gen diana. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción (también denominadas "secuencias de control"), es necesario para expresar un gen dado. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción incluyen, pero sin limitarse a ellas, secuencias promotoras, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio de la transcripción y secuencias de parada, secuencias de inicio de la traducción y de parada, y secuencias potenciadoras o activadoras. En un aspecto, el promotor es un promotor inducible. En otro aspecto, el promotor es inducible por un inductor seleccionado del grupo consistente en gentiobiosa, celulosa y soforosa. En un aspecto, el promotor es el promotor cbh1 de *T. reesei* que está depositado en el GenBank bajo el número de entrada D86235. En otro aspecto, el promotor es un promotor cbh II o promotor de xilanasas
45 procedente de *T. reesei*.
50

Como se usa en el presente texto, una "secuencia promotora" es una secuencia de DNA que es reconocida por el hongo filamentoso en particular, con fines de expresión. Un "promotor" se define como una matriz de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente texto, un promotor incluye secuencias necesarias de ácido nucleico en las proximidades del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de polimerasa tipo II, un elemento TATA. Un promotor "constitutivo" es un
55 promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. Un ejemplo de promotor inducible útil en la presente invención es el promotor cbh 1 de *T. reesei*. El término "unido operativamente" se refiere a un enlace fun-

cional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o matriz de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

5 Los ejemplos incluyen el promotor de genes de glucoamilasa de *A. awamori* o *A. niger* (Nunberg, J. H. et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 2306-2315; Boel, E. et al (1984) EMBO J. 3, 1581-1585), el gen de la carboxil proteasa de *Mucor miehei* en el presente texto, el gen de celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (Shoemaker, S. P. et al. (1984) Soli-
 10 citud de Patente Europea nº EPO0137280A1), el gen *trpC* de *A. nidulans* (Yelton, M. et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1470-1474; Mullaney, E. J. et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199, 37-45) el gen *alcA* de *A. nidulans* gen (Lockington, R. A. et al. (1986) Gene 33, 137-149), el gen *tpiA* de *A. nidulans* (McKnight, G. L. et al. (1986) Cell 46, 143-147), el gen *amdS* de *A. nidulans* (Hynes, M. J. et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1430-1439), el gen *xln1* de *T. reesei*, el gen *cbh2* de *T. reesei*, el gen *eg1* de *T. reesei*, el gen *eg2* de *T. reesei*, el gen *eg3* de *T. reesei*, y promoto-
 15 res de eucariotas superiores, tales como el promotor temprano SV40 (Barclay, S. L. y E. Meller (1983) Molecular and Cellular Biology 3, 2117-2130).

15 Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA que codifica un líder secretor, es decir, un péptido señal, está unido operativa-
 20 mente a DNA para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión con el ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está situa-
 25 do de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los po-
 30 tenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se realiza mediante ligación en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos, de acuerdo con la práctica convencional.

25 Como se usa en el presente texto, el término "gen" significa el segmento de DNA implicado en la producción de una cadena polipeptídica, que puede incluir o no regiones que preceden y siguen a la región de codificación, por ejem-
 30 plo, secuencias 5' no traducida (5' UTR) o "líder" y secuencias 3' UTR o "trailer", así como secuencias interpuestas (intrones) entre segmentos codificadores individuales (exones).

30 El gen puede codificar proteínas o péptidos terapéuticamente importantes, tales como factores de crecimiento, cito-
 35 cinas, ligandos, receptores e inhibidores, así como vacunas y anticuerpos. El gen puede codificar proteínas o pépti-
 40 dos industriales importantes, tales como enzimas, por ejemplo, proteasas, mananases, xilanasas, amilasas, gluco-
 45 milasas, celulasas, oxidasas y lipasas. El gen de interés puede ser un gen de origen natural, un gen mutado o un gen sintético.

35 El término "recombinante", cuando se usa en referencia p. ej. a una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector, han sido modificados por la introducción de un
 40 ácido nucleico o proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína nativos, o que esa célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuen-
 45 tran en la forma original (no recombinante) de la células o expresan genes nativos que, de otra forma, se expresan de forma anómala, se sub-expresan o no se expresan en absoluto.

40 La expresión "secuencia señal secretora" denota una secuencia de DNA que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de una
 45 ruta secretora de una célula en la que es sintetizado. El péptido más grande es comúnmente segmentado para eli-
 50 minar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

45 "Inducción" se refiere al incremento de la transcripción de un gen con el resultado de la síntesis de una proteína de interés en una célula u organismo a una velocidad francamente más alta en respuesta a la presencia de un "induc-
 50 tor". Para medir la inducción de una proteína de interés, las células tratadas con un inductor potencial se comparan con muestras testigo sin el inductor. A las muestras testigo (no tratadas con inductores) se les asigna un valor de actividad relativa de proteína del 100%. La inducción de un polipéptido se consigue cuando el valor de la actividad relativo al testigo (no tratado con inductores) es mayor que 100%, mayor que 110%, más preferentemente 150%, más preferentemente 200 a 500% (es decir, de dos a cinco veces más alto en relación con el testigo), o más preferentemente de 1000 a 3000% más alto.

55 Los "hongos filamentosos" de la presente invención son microorganismo eucariotas e incluyen todas la formas fila-
 60 mentosas de la subdivisión Eumycotina (véase Alexopoulos, C. J. (1962), Introductory Mycology, Nueva York: Wiley). Estos hongos están caracterizados por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, celu-
 65 losa, y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente invención son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. El crecimiento vegetativo en los hongos filamentosos es por alargamien-
 70 to hifal y el catabolismo del carbono es aerobio obligado. En cambio, el crecimiento vegetativo en las levaduras tales como *S. cerevisiae* es por brote de un talo unicelular, y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo. El *S. cerevisiae* tiene una fase diploide prominente, muy estable, mientras que los diploides existen solo brevemente antes de la meiosis en los hongos filamentosos, p. ej. *Aspergillus* y *Neurospora*. *S. cerevisiae* tiene 17 cromosomas, en

oposición a 8 y 7 para *A. nidulans* y *N. crassa* respectivamente. Ilustraciones recientes de las diferencias entre *S. cerevisiae* y los hongos filamentosos incluyen la incapacidad de *S. cerevisiae* para procesar intrones de *Aspergillus* y *Trichoderma* y la incapacidad para reconocer muchos reguladores transcripcionales de los hongos filamentosos (Innis, M. A. et al. (1985) Science, 228, 21-26).

5 "Glucosidasas" se refiere a cualquier enzima cuyo producto final es la glucosa.

El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que normalmente no se encuentran en la naturaleza en la misma relación entre sí. Por ejemplo, el ácido nucleico es típicamente producido por vía recombinante, teniendo dos o más secuencias, p. ej. a partir de genes no relacionados dispuestos para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, p. ej. un promotor procedente de una fuente y una región de codificación procedente de otra fuente. De un modo semejante, una proteína heteróloga se referirá frecuentemente a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (p. ej. una proteína de fusión).

Un "producto de incubación" se refiere a una solución que se mantuvo o se incubó a una temperatura elevada durante un periodo de tiempo específico.

15 Un "inductor" es cualquier compuesto que hace que las células produzcan cantidades de enzimas o de otras sustancias mayores que las que producirían de otra forma si el inductor estuviese ausente.

"Alimento inductor", se refiere a una solución alimentada a un microorganismo que causa o induce la producción del producto de proteína deseado.

20 Los términos "aislado" o "purificado", como se usan en el presente texto, se refieren a un ácido nucleico o un aminoácido que es retirado a partir de al menos un componente con el cual está naturalmente asociado.

II. Proteína de interés o proteína deseada.

Las expresiones "proteína de interés" y "proteína deseada" pueden usarse indistintamente en el presente texto. La presente invención es particularmente útil en la potenciación de la producción intracelular y/o extracelular de proteínas. La proteína puede ser homóloga o heteróloga. Entre las proteínas que pueden ser producidas por la presente invención se incluyen, pero sin limitarse a ellas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, citocinas, anticuerpos y similares.

Las hormonas incluyen, pero sin limitarse a ellas, hormona estimuladora del folículo, hormona luteinizante, factor de liberación de corticotropina, somatostatina, hormona gonadotropina, vasopresina, oxitocina, eritropoietina, insulina y similares.

30 Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores en la superficie de la célula, con el principal resultado de activar la proliferación y/o la diferenciación celular. Los factores de crecimiento incluyen, pero sin limitarse a ellos, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factores de crecimiento de los fibroblastos, factores de crecimiento similares a la insulina, factores de crecimiento transformantes, y similares.

35 Las citocinas son una familia peculiar de factores de crecimiento. Segregadas principalmente por los leucocitos, las citocinas estimulan las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares, así como la activación de las células fagocíticas. Las citocinas incluyen, pero sin limitarse a ellos, factores estimuladores de colonias, las interleucinas (IL-1 (α y β), IL-2 a IL-13) y los interferones (α , β y γ).

40 La Interleucina-3 (IL-3) humana es una proteína de 15 kDa que contiene 133 restos de aminoácido. La IL-3 es un factor estimulador de colonias específico de la especie que estimula la formación de colonias de megacariocitos, neutrófilos y macrófagos a partir de cultivos de médula ósea.

Los anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a ellos, inmunoglobulinas procedentes de cualquier especie a partir de la cual se desea producir grandes cantidades. Es especialmente preferido que los anticuerpos sean anticuerpos humanos. Las inmunoglobulinas pueden ser de cualquier clase, es decir, G, A, M, E o D.

45 Adicionalmente, una "proteína de interés" o un "polipéptido de interés" se refiere a la proteína a expresar y a segregar por la célula hospedadora. La proteína de interés puede ser cualquier proteína que hasta ahora ha sido considerada para la expresión en procariotas. En una realización, la proteína de interés que es expresada y segregada incluye proteínas que comprenden a péptido señal. La proteína de interés puede ser homóloga o bien heteróloga para el hospedador. Así, una proteína de interés puede ser un polipéptido segregado, en particular una enzima que se elige entre enzimas amilolíticas, enzimas proteolíticas, enzimas celulolíticas, enzimas oxido- o reductasa y enzimas degradadoras de la pared vegetal. Entre los ejemplos de estas enzimas se incluyen las amilasas, proteasas, xilanasas, lipasas, lacasas, fenol oxidasas, oxidasas, cutinasas, celulasas, hemicelulasas, esterases, perioxidasas, catalasas, glucosa oxidasas, fitasas, pectinasas, glucosidasas, isomerasas, transferasas, galactosidasas y quitinasas. El

polipéptido segregado puede también ser una hormona, un factor de crecimiento, un receptor, una vacuna, un anticuerpo o similares. En una realización el polipéptido segregado es una enzima celulolítica.

III. Biología molecular.

5 Se describe en el presente texto la expresión de genes heterólogos bajo el control de los promotores del gen de la celulasa de *Trichoderma reesei*. Por consiguiente, esta invención se basa en técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Entre los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención se incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994)).

10 Genes heterólogos que comprenden las secuencias promotoras del gen de la celulasa de hongos filamentosos son típicamente clonados a vectores intermedios antes de la transformación en células de *Trichoderma reesei* para la replicación y/o expresión. Estos vectores intermedios son típicamente vectores procarióticos, p. ej. plásmidos, o vectores lanzadera.

15 Para obtener un elevado nivel de expresión de un gen clonado, el gen heterólogo se sitúa preferentemente a aproximadamente la misma distancia del promotor que en el gen de la celulasa de origen natural. Como se sabe en la técnica, sin embargo, se puede dar cabida a una cierta variación en esta distancia sin pérdida de la función del promotor.

Los profesionales expertos en la técnica saben que un promotor natural puede ser modificado por reemplazo, sustitución, adición o eliminación de uno o más nucleótidos sin cambiar su función. La práctica de la invención comprende, y no está obligada por, tales alteraciones del promotor.

20 El vector de expresión vector/construcción contiene típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión de la secuencia heteróloga. Una casete de expresión típica contiene entonces un promotor unido operativamente a la secuencia heteróloga de ácidos nucleicos y señales requeridas para la poliadenilación eficiente del material transcrito, sitios de unión con el ribosoma, y terminación de la traducción. Otros elementos de la casete pueden incluir potenciadores y, si se usa DNA genómico como gen estructural, intrones con donante de ajuste funcional y sitios aceptores.

25 La práctica de los métodos descritos en el presente texto no está constreñida por la elección del promotor en la construcción genética. Sin embargo, son promotores ejemplares los promotores de *Trichoderma reesei cbh1, cbh2, eg1, eg2, eg3, eg5, xln1 y xln2*.

30 Además de una secuencia promotora, la casete de expresión debe contener también una región de terminación de la transcripción secuencia abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficiente. La región de terminación puede obtenerse del mismo gen que la secuencia promotora o puede obtenerse de genes diferentes.

35 Aunque es probable que cualquier terminador fúngico sea funcional en la presente invención, los terminadores preferidos incluyen: el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans* (Yelton, M. et al. (1984) PNAS USA 81 :1470-1474, Mullaney, E. J. et al. (1985) MGG 199:37-45), los genes de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* o *Aspergillus Niger* (Nunberg, J. H. et al. (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306, Boel, E. et al. (1984) EMBO J. 3:1581-1585) y el gen de la carboxil proteasa de *Mucor miehei* (Publicación EPO N° 0 215 594).

40 El vector de expresión concreto usado para transportar la información genética a las células no es particularmente crítico. Puede usarse cualquiera de los vectores convencionales utilizados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacterianos estándar incluyen los bacteriófagos λ y M13, así como plásmidos tales como los plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D, y sistemas de expresión de fusión tales como MBP, GST y LacZ. También pueden añadirse etiquetas de epítipo a proteínas recombinantes para proporcionar métodos de aislamiento convenientes, p. ej. c-myc.

45 Los elementos que son típicamente incluidos en vectores de expresión incluyen también un replicón, un gen que codifica la resistencia a antibiótico para permitir la selección de bacterias que alberguen plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido, para permitir la inserción de secuencias heterólogas. El gen de resistencia a antibiótico elegido en particular no es crítico, siendo adecuados en la técnica cualquiera de los muchos genes de resistencia. Las secuencias procarióticas se eligen preferentemente de forma que no interfieran con la replicación o la integración del DNA en *Trichoderma reesei*.

50 Los métodos de transformación descritos en el presente texto pueden tener por resultado la integración estable de la totalidad o de una parte del vector de transformación en el genoma del hongo filamentosos. Sin embargo, también se contempla la transformación resultante en el mantenimiento de un vector de transformación extracromosómico auto-replicante.

55 Pueden usarse muchos métodos estándar de transfección para producir líneas de células de *Trichoderma reesei* que expresan grandes cantidades de la proteína heteróloga. Algunos de los métodos publicados para la introducción de construcciones de DNA en cepas de *Trichoderma* productoras de celulasa incluyen Lorito, Hayes, DiPietro y

Harman, 1993, *Curr. Genet.* 24: 349-356; Goldman, VanMontagu y Herrera-Estrella, 1990, *Curr. Genet.* 17: 169-174; Penttila, Nevalainen, Ratto, Salminen y Knowles, 1987, *Gene* 6: 155-164 para *Aspergillus* Yelton, Hamer y Timberlake, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474 para *Fusarium* Bajar, Podila y Kolattukudy, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8202-8212, para *Streptomyces* Hopwood et al., 1985, The John Innes Foundation, Norwich, UK y para *Bacillus* Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi y Matteuzzi, 1990, *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 135-138).

Sin embargo, puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extrañas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, biolística, liposomas, microinyección, vectores de plasma, vectores virales y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir DNA genómico clonado, cDNA, DNA sintético u otro material genético extraño en una célula hospedadora (véase, p. ej. Sambrook et al., *supra*). También puede usarse el método de transfección mediado por *Agrobacterium* descrito en la patente de EE.UU. nº 6.255.115. Solamente es necesario que el procedimiento de ingeniería genética usado en particular sea capaz de introducir con éxito al menos un gen en la célula hospedadora capaz de expresar el gen heterólogo.

Después de haber introducido el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan bajo condiciones que favorecen la expresión de genes bajo el control de secuencias promotoras del gen de la celulasa. Pueden cultivarse grandes tandas de células transformadas como se describe más adelante. Finalmente, el producto se recupera del cultivo usando técnicas estándar.

Se describe en el presente texto la expresión y la secreción potenciada de polipéptidos deseados cuya expresión está bajo el control de secuencias promotoras del gen de la celulasa, incluyendo genes de celulasa de origen natural, secuencias de DNA de fusión, y varias construcciones heterólogas. También se describen procedimientos para expresar y segregar altos niveles de tales polipéptidos deseados.

IV. Hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota. Los hongos filamentosos se caracterizan por el micelio vegetativo que tiene una pared celular compuesta de quitina, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos, con crecimiento vegetativo por alargamiento hifal y catabolismo del carbono que es aerobio obligado.

La célula precursora del hongo filamentosos puede ser una célula de una especie, sin limitarse a ellas, entre *Trichoderma*, p. ej. *Trichoderma longibrachiatum* (*reesei*), *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*; *Penicillium* sp.; *Humicola* sp., incluyendo *Humicola insolens*; *Chrysosporium* sp., incluyendo *C. lucknowense*; *Gliocladium* sp.; *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., *Hypocrea* sp., y *Emericella* sp. Como se usa en el presente texto, el término "*Trichoderma*" o "*Trichoderma* sp." se refiere a cualquier cepa fúngica que previamente ha sido clasificada como *Trichoderma* o es actualmente clasificada como *Trichoderma*.

En una realización preferida, la célula precursora del hongo filamentosos es una célula de *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus aculeatus*, o *Aspergillus nidulans*.

En otra realización preferida, la célula precursora del hongo filamentosos es una célula de *Trichoderma reesei*.

V. Expresión de proteína.

Las proteínas pueden ser producidas cultivando células transformadas con un vector de expresión que contiene genes cuya expresión está bajo el control de secuencias promotoras del gen de la celulasa. La presente invención es particularmente útil para potenciar la producción intracelular y/o extracelular de proteínas. La proteína puede ser homóloga o heteróloga. Las proteínas que pueden ser producidas por la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, citocinas, anticuerpos y similares.

Las enzimas incluyen, pero sin limitarse a ellas, hidrolasas, tales como proteasa, esterasa, lipasa, fenol oxidasa, permeasa, amilasa, pululanasa, xilanasa, celulasa, glucosa isomerasa, lacasa y proteína disulfuro isomerasa.

Las hormonas incluyen, pero sin limitarse a ellas, hormona estimuladora del folículo, hormona luteinizante, factor de liberación de corticotropina, somatostatina, hormona gonadotropina, vasopresina, oxitocina, eritropoietina, insulina y similares.

Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores en la superficie de la célula, con el resultado principal de que activan la proliferación y/o la diferenciación celular. Los factores de crecimiento incluyen, pero sin limitarse a ellos, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento nervioso, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento similares a la insulina, factores de crecimiento transformantes, y similares.

Las citocinas son una familia peculiar de factores de crecimiento. Segregadas principalmente a partir de los leucocitos, las citocinas estimulan la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular, así como la activación de las células

fagocíticas. Las citocinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, factores de estimulación de colonias, las interleucinas (IL-1 α y β , IL-2 a IL-13) y los interferones (α , β y γ).

5 La interleucina-3 humana (IL-3) es una proteína de 15 kDa que contiene 133 restos de aminoácidos. La IL-3 es un factor estimulador de colonias específico de la especie, que estimula la formación de colonias de megacariocitos, neutrófilos y macrófagos a partir de cultivos de médula ósea.

Los anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a ellos, inmunoglobulinas de cualquier especie de la que se desee producir grandes cantidades. Es especialmente preferido que los anticuerpos sean anticuerpos humanos. Las inmunoglobulinas pueden ser de cualquier clase, es decir, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE.

10 Las proteínas de interés pueden también ser modificadas de manera que formen moléculas quiméricas que comprenden una proteína de interés fusionada con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En una realización, tal molécula quimérica comprende una fusión de la proteína de interés con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta se pone generalmente en el término amino o carboxilo de la proteína de interés.

15 Varios polipéptidos etiqueta y sus correspondientes anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gli); HIS6 y etiquetas de quelación de metal, el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra la misma (Evan et al., *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus Herpes Simplex y su anticuerpo (Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6):547-553 (1990)). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido FLAG (Hopp et al., *BioTechnology* 6:1204-1210 (1988)); el péptido epítipo KT3 (Martin et al., *Science* 255:192-194 (1992)); el péptido epítipo tubulina (Skinner et al., *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166 (1991)); y la etiqueta péptido de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6393-6397 (1990)).

20 En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína de interés con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, tal fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG.

25 Las condiciones apropiadas para la expresión de dichos genes comprenden proporcionar al cultivo una composición de alimentación inductora de la presente invención. Las condiciones óptimas para la producción de las proteínas variarán con la elección de la célula hospedadora, y con la elección de la proteína que se ha de expresar. Tales condiciones serán averiguadas con facilidad por un profesional experto en la técnica mediante experimentación rutinaria o mediante optimización.

30 La proteína de interés es típicamente purificada o aislada después de la expresión. La proteína de interés puede ser aislada o purificada de diversas formas conocidas por los expertos en la técnica, que dependen de cuáles son los demás componentes que están presentes en la muestra. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas y cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, cromatografía HPLC hidrófoba, de afinidad y de fase inversa, y cromatografía. Por ejemplo, la proteína de interés puede ser purificada usando una columna estándar de anticuerpo anti-proteína de interés. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteína, son también útiles. Para una guía general en técnicas adecuadas de purificación, véase Campos, Purificación de Proteína.

35 El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso de la proteína de interés. En algunos casos no será necesaria ninguna purificación.

40 VI. Fermentación.

El método descrito en el presente texto se basa en procedimientos de fermentación para cultivar hongos y bacterias. Son conocidos en la técnica procedimientos de fermentación para la producción de enzimas de celulosa. Por ejemplo, pueden producirse enzimas de celulasa mediante cultivo sólido o bien por cultivo sumergido, incluyendo procesos por cargas, lote alimentado (semicontinuos) y continuos.

45 El cultivo se realiza en un medio de crecimiento que comprende un medio acuoso con sales minerales, factores orgánicos de crecimiento, el material fuente de carbono y energía, oxígeno molecular y, desde luego, un inóculo de partida de una o más especies de microorganismos particulares a emplear.

50 Además de la fuente de carbono y energía, oxígeno, nitrógeno asimilable y un inóculo del microorganismo, es necesario suministrar cantidades adecuadas, en las proporciones apropiadas, de nutrientes minerales para asegurar el crecimiento del microorganismo apropiado, maximizar la asimilación de la fuente de carbono y energía por las células en el proceso de conversión microbiana, y conseguir el máximo rendimiento de células con la densidad celular máxima en el medio de fermentación.

55 La composición del medio acuoso mineral puede variar en un amplio margen, dependiendo en parte del microorganismo y el sustrato empleados, como es sabido en la técnica. El medio mineral incluirá, además de nitrógeno, canti-

dades adecuadas de fósforo, magnesio, calcio, potasio, azufre y sodio, en formas adecuadas iónicas y combinadas asimilables solubles, y también deberán estar presentes preferentemente ciertos elementos traza tales como cobre, manganeso, molibdeno, zinc, hierro, boro y yodo, y otros, también en este caso en una forma asimilable soluble adecuada, como se sabe en la técnica.

5 La reacción de fermentación es un proceso aerobio en el que el oxígeno molecular que se necesita es suministrado por un gas que contiene oxígeno molecular, tal como aire, aire enriquecido en oxígeno, o incluso oxígeno molecular sustancialmente puro, con la condición de que mantenga el contenido del recipiente de fermentación con una presión parcial de oxígeno adecuada, efectiva para ayudar a la especie de microorganismo a crecer de forma próspera. En efecto, usando un sustrato de hidrocarburo oxigenado, el requerimiento de oxígeno para el crecimiento del microorganismo se reduce. Sin embargo, se ha de suministrar oxígeno molecular para el crecimiento, ya que la asimilación del sustrato y el correspondiente crecimiento de los microorganismos, es, en parte, un proceso de combustión.

10 Aunque la velocidad de aireación puede variar en un margen considerable, la aeración se realiza generalmente a una velocidad que está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 10, preferentemente aproximadamente de 0,5 a 7 volúmenes (a la presión empleada y a 25°C) de gas que contiene oxígeno por unidad de volumen de líquido en el fermentador y por minuto. Esta cantidad se basa en el aire de un contenido de oxígeno normal que se suministra al reactor, y en términos de oxígeno puro los márgenes respectivos sería de aproximadamente 0,1 a 1,7, o preferentemente aproximadamente de 0,1 a 1,3 volúmenes (a la presión empleada y a 25°C) de gas que contiene oxígeno, por unidad de volumen de líquido en el fermentador y por minuto.

20 La presión empleada para el proceso microbiológico de conversión puede variar ampliamente. Generalmente las presiones están en el intervalo de aproximadamente 0 a 345 KPa, en la actualidad preferiblemente aproximadamente de 0 a 207 KPa, más preferiblemente al menos ligeramente por encima de la presión atmosférica, como equilibrio de los costes de equipo y de funcionamiento frente a la solubilidad del oxígeno. Presiones mayores que la atmosférica son ventajosas por cuanto tales presiones tienden a aumentar la concentración del oxígeno disuelto en el líquido de fermentación acuoso, lo que a su vez puede contribuir a hacer que aumenten los valores de la velocidad de crecimiento de las células. Al mismo tiempo, esto se contrarresta por el hecho de que las presiones elevadas hacen aumentar los costes de equipo y de funcionamiento.

25 La temperatura de fermentación puede variar algo, pero para los hongos filamentosos tales como *Trichoderma reesei* la temperatura estará generalmente dentro del margen de aproximadamente 20°C a 40°C, generalmente de forma preferible en el margen de aproximadamente 25°C a 34°C, dependiendo de la cepa del microorganismo elegida.

30 Los microorganismos requieren también una fuente de nitrógeno asimilable. La fuente de nitrógeno asimilable puede ser cualquier compuesto o compuestos que contengan nitrógeno, capaces de liberar nitrógeno en una forma adecuada para la utilización metabólica por el microorganismo. Aunque pueden emplearse diversos compuestos orgánicos fuente de nitrógeno, tales como hidrolizados de proteína, normalmente pueden utilizarse compuestos nitrogenados baratos, tales como amoníaco, hidróxido amónico, urea y varias sales de amonio tales como fosfato amónico, sulfato amónico, pirofosfato amónico, cloruro amónico, o varios otros compuestos amónicos. El propio amoníaco gaseoso es conveniente para operaciones a gran escala, y puede ser empleado haciéndolo burbujear a través del líquido acuoso de fermentación (medio de fermentación) en cantidades adecuadas. Al mismo tiempo, tal amoníaco puede emplearse también para ayudar a controlar el pH.

35 El intervalo de pH en el fermento microbiano acuoso (mezcla de fermentación) debe estar en el margen ejemplar de aproximadamente 2,0 a 8,0. Con hongos filamentosos, el pH está normalmente dentro del intervalo de aproximadamente 2,5 a 8,0; con *Trichoderma reesei*, el pH normalmente está dentro del intervalo de aproximadamente 3,0 a 7,0. Las preferencias del intervalo de pH para ciertos microorganismos dependen hasta cierto punto del medio empleado, así como del microorganismo en particular, y así cambian algo con el cambio de medio, como puede ser fácilmente determinado por los expertos en la técnica.

40 Preferiblemente, la fermentación se lleva a cabo de manera que el sustrato que contiene carbono pueda ser controlado como factor limitante, proporcionando de esta forma una buena conversión en células del sustrato que contiene carbono, y evitando la contaminación de las células con una cantidad sustancial de sustrato no convertido. Este último no es un problema con sustratos solubles en agua, ya que cualquier traza que quede se elimina por lavado fácilmente. Sin embargo, sí que puede ser un problema en el caso de sustratos insolubles en agua, y requiere etapas de tratamiento del producto adicionales, tales como etapas de lavado adecuadas.

45 Como se describió anteriormente, el tiempo para alcanzar este nivel no es crítico y puede variar con el microorganismo en particular y con el proceso de fermentación que se está llevando a cabo. Sin embargo, es bien sabido en la técnica cómo determinar la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación, y si se ha conseguido o no el nivel deseado de fuente de carbono.

Aunque la fermentación puede ser realizada como operación por tandas o continua, la operación en lote alimentado es mucho más preferida por la facilidad de su control, por la producción de cantidades uniformes de productos, y por el uso más económico de todo el equipo.

5 Si se desea, una parte o la totalidad del material fuente de carbono y energía y/o parte de la fuente de nitrógeno asimilable tal como el amoníaco, pueden ser añadidos al medio mineral acuoso antes de alimentar el medio mineral acuoso al fermentador.

10 Cada una de las corrientes introducidas en el reactor se controla preferiblemente a una velocidad predeterminada, o en respuesta a una necesidad determinable por monitorización, tal como la concentración de sustrato fuente de carbono y de energía, pH, oxígeno disuelto, oxígeno o dióxido de carbono en los gases de salida del fermentador, densidad de células, que puede medirse por la transmitancia de luz, o similares. Las velocidades de alimentación de los diversos materiales pueden variarse para obtener un crecimiento de las células lo más rápido posible, consistente con la eficiente utilización de las fuentes de carbono y energía, para obtener un rendimiento de células del microorganismo en relación con la carga de sustrato, tan elevado como sea posible.

15 Aunque el tiempo medio de retención de la mezcla de fermentación en el fermentador puede variar considerablemente, dependiendo en parte de la temperatura de fermentación y del cultivo empleado, generalmente estará dentro del intervalo de aproximadamente 24 a 500 horas, preferiblemente en la actualidad aproximadamente 24 a 400 horas.

20 Bien sea en operación por tandas o bien en la preferida operación de lote alimentado, todo el equipo, reactor, medios de fermentación, depósitos o recipientes, tuberías, dispositivos concomitantes de circulación o de enfriamiento, y similares, son inicialmente esterilizados, habitualmente empleando vapor de agua tal como un vapor a aproximadamente 121°C, durante al menos aproximadamente 15 minutos. El reactor esterilizado es después inoculado con un cultivo del microorganismo seleccionado, en presencia de todos los nutrientes requeridos, incluyendo el oxígeno, y el sustrato que contiene carbono. El tipo de fermentador empleado no es crítico, aunque actualmente se prefiere la operación en Biolafitte de 15 L (Saint-Germain-en-Laye, Francia).

25 La recogida y la purificación de las enzimas de celulosa del caldo de fermentación puede hacerse también por procedimientos conocidos en la técnica. El caldo de fermentación contendrá generalmente residuos de células, incluyendo células, varios sólidos suspendidos y otros contaminantes de la biomasa, así como el producto enzimático de celulosa deseado, que preferiblemente se eliminan del caldo de fermentación por medios conocidos en la técnica.

30 Los procedimientos adecuados para tal eliminación incluyen técnicas de separación sólido-líquido convencionales, tales como, p. ej., centrifugación, filtración, diálisis, microfiltración, filtración rotatoria a vacío, u otros procedimientos conocidos, para producir un filtrado libre de células. Puede ser preferible concentrar más el caldo de fermentación o el filtrado libre de células antes de la cristalización usando técnicas tales como ultrafiltración, evaporación o precipitación.

35 La precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o el filtrado puede realizarse por medio de una sal, p. ej. sulfato amónico, seguida por la purificación mediante una diversidad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o procedimientos similares reconocidos en la técnica.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen se ofrecen para ilustrar, no para limitar, la invención reivindicada.

40 Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra cómo se preparó una composición de alimentación inductora para estimular la expresión de genes de la celulasa en *Trichoderma reesei*. La incubación se llevó a cabo al pH de la solución, es decir, 5,0. Se encontró que para la beta-glucosidasa la incubación era la mejor a un pH 4,0 – 6,5.

(i) Una solución de glucosa 60% (p/p) fue esterilizada durante 30 minutos a 121°C, 2,2 bares de presión.

45 (ii) El preparado estéril de celulasa completa se añadió a la solución de glucosa a una concentración final de 10 g de proteína total /L.

(iii) El depósito que contiene la mezcla de glucosa y celulasa completa se mantuvo a 65°C durante 3 días con agitación de 75 rpm.

50 (iv) Después de la incubación, la solución estéril se recolectó en un recipiente apropiado para la alimentación de la fermentación.

Se encontró que la composición de alimentación inductora resultante tenía 16,1 g/L de soforosa, 47,5 g/L de gentiobiosa, y aproximadamente 600 g/L de glucosa. Puede haber otros azúcares presentes pero no fueron analizados.

Las soluciones de alimentación inductoras se han preparado también a partir de soluciones de glucosa al 20% y al 60%. Cuanto más alta es la concentración de la solución de glucosa, tanto más alta es la concentración final de soforosa.

5 El preparado de celulasa completa ha sido usado a concentraciones finales de 2 g y 10 g de proteína total /L. Cuanto más alta es la carga de proteína, tanto más alta es la concentración final de soforosa. Véase la Figura 6. Al final, sin embargo, se espera que una reacción más larga a la concentración más baja de preparado de celulasa completa conseguirá los mismos niveles de soforosa si la solución se incubó durante un periodo de tiempo más largo.

La temperatura de incubación influye también en la producción de soforosa. Por ejemplo, la concentración de soforosa fue el doble cuando la composición se incubó a 65°C, que cuando la composición fue incubada a 50°C.

10 Ejemplo 2

El ejemplo que sigue detalla cómo se prepara y se usa una alimentación de glucosa/soforosa, para producir enzima celulasa durante la fermentación.

I. Producción de alimentación de glucosa/soforosa:

15 Una solución de glucosa al 60% (p/p) se disolvió y se esterilizó durante 30 minutos a 121°C. La temperatura se bajó a 65°C y se añadieron 10 g/L de proteína total (celulasa completa producida previamente por *T. reesei*). La mezcla se agitó lentamente y se mantuvo a 65°C durante 3 días. El contenido de soforosa se midió a 12 g/L en esta solución de glucosa al 60%.

II. Fermentación

20 Se inocularon 0,8 L de medio con 1,5 ml de suspensión de esporas congeladas de *Trichoderma reesei* RL-P37 como frasco de siembra. Este frasco se dividió en dos porciones de 0,4 L y se transfirieron a 2 x 7 L de medio de fermentación en dos fermentadores de 15 L Biolafitte diferentes, después de 48 horas. El medio de crecimiento tenía la siguiente composición:

Componente del medio	g/L
KH ₂ PO ₄	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,35
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,53
Glucosa	50
Sólidos de jarabe de maíz (Roquette)	6,25
Elementos traza*	1 ml/L
Elementos traza [*] : 5 g/L de FeSO ₄ · 7 H ₂ O; 1,6 g/L de MnSO ₄ · H ₂ O; 1,4 g/L de ZnSO ₄ ·7H ₂ O.	

El fermentador se hizo funcionar a 25°C, 750 rpm y con un caudal de aire de 8 litros estándar por minuto (SLM).

25 La glucosa/soforosa fue añadida en vez de glucosa en la fase por tandas para el depósito experimental, pero se usó glucosa pura en el control. Esta glucosa en tanda se agotó a aproximadamente las 20 horas, punto en el cual las células dejaron de desarrollarse y se inició una alimentación limitante de carbono. Se añadió una alimentación de 40% de glucosa/soforosa a razón de 0,25 g/minuto alimentándose solución de glucosa al 40% pura al depósito de control (diluida a partir de la formación de la alimentación detallada antes). La proteína total, que está directamente correlacionada con la producción de celulasa (basándose en la comparación de la proteína extracelular total frente a la actividad de celulasa), fue inducida justo después de la fase de tanda en el depósito de glucosa/soforosa pero no en el depósito de control de glucosa. Así pues, se requiere el pretratamiento de la glucosa con celulasa completa para producir celulasa en glucosa con *Trichoderma reesei* RL-P37. Véase la Figura 1.

Ejemplo 3

35 El ejemplo que sigue detalla cómo se prepara y se usa una alimentación de glucosa/soforosa para producir una proteína heteróloga a partir de un hongo filamentoso durante la fermentación.

La composición de alimentación inductora se prepara usando el procedimiento del Ejemplo 1.

Un plásmido de expresión para ser usado en la transformación de *Trichoderma reesei* se construye de la manera que sigue. Los extremos del gen que codifica la proteína de interés se hacen romos mediante DNA polimerasa T4 y

se insertan en el sitio de restricción Pmel del vector de expresión de *Trichoderma*, pTEX, véase la Publicación PCT N° WO 96/23928, la cual publicación se incorpora a la presente memoria por referencia, que contiene un promotor CBHI y terminador para expresión génica y un gen *pyr4* de *Trichoderma* como marcador de selección para transformantes. El fragmento lineal de DNA que contiene solamente el promotor CBH1, el gen que codifica la proteína de interés, el terminador CBH1 y el marcador de selección *pyr4* se aísla de un gel y se usa para transformar una cepa auxótrofa a uridina de *Trichoderma reesei* (véase la patente de EE.UU. n° 5.472.864) que tiene los cuatro genes de celulasa principales borrados. Los transformantes estables se aíslan en placas mínimas de *Trichoderma* sin uridina. Los transformantes se desarrollan en 50 ml de medio Proflo en frascos de agitación durante 4 días a una temperatura entre 28°C y 30°C y la expresión de la proteína de interés se ensaya por métodos conocidos por los expertos en la técnica. El medio Proflo está compuesto por (g/l) Proflo 22,5; lactosa 30,0; (NH₄)₂SO₄ 6,5; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄·7 H₂O 0,3; CaCl₂ 0,2; CaCO₃ 0,72; solución madre de metales traza 1,0 ml/l y 10% de Tween 80 2,0 ml/l. La solución madre de metales traza usada tenía (g/l) FeSO₄·7H₂O 5,0; MnSO₄·H₂O 1,6; ZnSO₄·7H₂O 1,4; CoCl₂·6 H₂O 2,8.

Los frascos de agitación se dividen y se ponen en un fermentador de 15 L como se describe en el Ejemplo 2. La expresión de la proteína de interés se induce induciendo la composición de alimentación pero no la solución de glucosa.

Ejemplo 4.

Este ejemplo detalla cómo se puede inmovilizar la enzima para la producción de una solución de alimentación inductora.

Un caldo de celulasa completa que comprende una β-glucosidasa es inmovilizado de acuerdo con el método descrito en la patente de EE.UU. n° 5.541.097. De forma resumida, se añadieron 10 g de bentonita en 500 ml de agua a la que se añadió 11 ml de PEI al 10%. Por separado, se añadieron 20 ml de celulasa completa (200 g/L de proteína total) a 250 ml de tampón de acetato 0,02 M a pH 5,5. Después se añadieron 4,44 ml de glutaraldehído al 50% (Fischer, calidad para reactivo) a la solución de enzima mientras se mantiene el pH en 5,5. Al cabo de 2 horas el complejo de enzima se añadió al complejo de bentonita dando un volumen total de aproximadamente 750 ml. Esta mezcla se agitó durante la noche a 4°C. Después se recogió el complejo en un embudo Buchner y se lavó con una gran cantidad de agua. Después se resuspendió la torta en tampón de acetato 0,02 M, con un peso final de 175 g.

Es difícil cuantificar la actividad de enzima que queda después de la inmovilización, porque la celulasa completa contiene más de cinco enzimas diferentes, cada una de ellas con distintas actividades (se demostró que la enzima inmovilizada reduce la viscosidad de la suspensión de harina de cebada, de forma que se supo que había presente actividad de celulasa). Por consiguiente, la carga de celulasa se hizo basándose en la cantidad de enzima que estaba inmovilizada, no en la cantidad que quedaba activa. Se determinó que la suspensión final contenía 0,022 g de proteína total/g de suspensión.

La producción de soforosa a partir de la celulasa inmovilizada se examinó a dos diferentes cargas de enzima y concentraciones de glucosa:

- 1) 23 g de suspensión + 29,5 ml de glucosa al 67% (p/p) = 10 g/L carga de proteína a 40,7% de glucosa
- 2) 7,6 g de suspensión + 44,8 ml de glucosa al 67% (p/p) = 3,2 g/L carga de proteína a 60% de glucosa

Cada 52,5 ml de volumen fueron añadidos a un matraz de Erlenmeyer de 250ml, se agitó a 100 rpm y se incubó a 65°C a lo largo de varios días.

La velocidad de producción de soforosa para cada uno de los dos casos fue menor que en el caso del control, en el que se añadió la misma cantidad de solución de enzima que de enzima inmovilizada (Figuras 2 - 3). Esto no era sorprendente ya que se supone que algo de la actividad de la enzima se pierde cuando se inmoviliza la enzima. Sin embargo, la gran ventaja de la inmovilización es que la enzima puede usarse para hacer múltiples tandas de alimento de glucosa/ soforosa. La Figura 4 muestra que centrifugando la enzima inmovilizada fuera de la solución de glucosa y repitiendo el experimento como se señaló anteriormente, se consiguen los mismos títulos finales de soforosa en el primero y en el segundo experimento. Esto indica que la enzima es aún activa a lo largo de al menos dos usos, y probablemente a lo largo de muchos más. Por consiguiente, incluso con alguna pérdida de actividad enzimática por la inmovilización, la facultad de volver a emplear la enzima varias veces hace a la inmovilización de la celulasa la alternativa más atractiva para la producción de glucosa/ soforosa.

Ejemplo 5

Este ejemplo detalla cómo puede realizarse la producción de una solución de alimento inductora con el uso de celobiosa como fuente de carbono de partida.

Los experimentos fueron llevados a cabo de forma exactamente igual que los otros ejemplos de producción de soforosa en frascos de agitación (50 ml en frasco de 250 ml, 65°C, 100 rpm) excepto para lo que se indica más adelante. La Figura 5 compara la producción de soforosa en celobiosa al 25% con la producida en glucosa al 25%.

- 5 Si la soforosa es el "verdadero" inductor en la naturaleza, tendría que haberse formado lo más probablemente a partir de celobiosa ya que *T. reesei* es muy improbable que vea niveles ni siquiera moderados de glucosa en la naturaleza, que se requerirían para formar soforosa por la vía de la transglicosilación. La Figura 5 muestra celobiosa al 25% (p/p) incubada con 10 g/L de celulasa en comparación con glucosa al 25%. La soforosa producida a partir de celobiosa hizo un pico a más de 10 g/L, tres veces la concentración que fue producida por glucosa sola. Sin embargo, esa soforosa fue después degradada a un nivel similar al que se produce a partir de glucosa sola (4,1 g/L frente a 2,5 g/L). Este comportamiento parece mostrar a la soforosa acercándose a un equilibrio con la glucosa, que fue todo lo que quedó después de que toda la celobiosa fue segmentada alrededor de 29 horas.
- 10 Es muy improbable que la enzima β -glucosidasa vea una concentración de glucosa suficiente para formar mucha soforosa en la naturaleza. Es más probable que las células vean altas concentraciones de celobiosa, un producto de la rotura de la celulosa. La Figura 5 muestra que se produce tres veces la cantidad de soforosa a partir de celobiosa que de glucosa. El nivel de soforosa parece caer al mismo tiempo que la celobiosa es convertida completamente en glucosa y otros productos de transglicosilación aproximadamente a la 29 horas (no se muestran datos de celobiosa). Esto apoyaría un mecanismo hipotético en el que la celobiosa es segmentada en dos moléculas de glucosa que
- 15 después se redistribuyen y se transglicosilan antes de dejar el sitio activo. Al proseguir el experimento de la celobiosa, la velocidad de segmentación de la soforosa era mayor que la velocidad de formación de soforosa a partir de transglicosilación de la glucosa y el nivel de soforosa cayó a casi el de la glucosa, 4,1 g/L en comparación con 2,5 g/L. Este dato apoya claramente la posibilidad de que pequeñas cantidades de soforosa se formen a través de la segmentación de celobiosa por la β -glucosidasa.
- 20 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente texto tienen propósito solamente ilustrativo y que los profesionales expertos en la técnica sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos, como se define en las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de alimentación inductora, para inducir la expresión de un gen bajo el control de un promotor inducible por soforosa o un promotor inducible por gentiobiosa, comprendiendo dicho método las etapas de
 - 5 (a) proporcionar un preparado de celulasa completa de *Trichoderma reesei* que es un caldo de fermentación final, opcionalmente aislado de las células de la fermentación;
 - (b) mezclar una solución de glucosa pura que comprende de 50% a 75% (p/p) de glucosa con el preparado de celulasa completa de *Trichoderma reesei* para dar una primera mezcla, teniendo la primera mezcla una actividad de beta-glucosidasa de 1,5 UI/ml a 180 UI/ml; y
 - 10 (c) incubar la primera mezcla a una temperatura de 50°C a 75°C y durante un tiempo suficiente para producir la composición de alimentación inductora;

en donde el preparado de celulasa completa comprende

 - (i) una o más beta-glucosidasas; y
 - (ii) una o más endoglucanasas y una o más celobiohidrolasas;
- 15 en donde la composición de alimentación inductora comprende soforosa en una concentración que se encuentra en el intervalo de 2 g/L a 25 g/L, y gentiobiosa en una concentración que se encuentra en el intervalo de 35 g/L a 60 g/L.
2. Un método para preparar una proteína codificada por un gen bajo el control de un promotor inducible por soforosa o un promotor inducible por gentiobiosa, comprendiendo el método:
 - 20 preparar una composición de alimentación inductora por el método según la reivindicación 1^a;
 - proporcionar un cultivo de células que comprenden dicho gen; y
 - poner en contacto dicho cultivo de células con dicha composición de alimentación inductora en una cantidad efectiva para inducir la expresión de dicho gen.
3. El método según la reivindicación 2, en el que la proteína es una celulasa endógena.
- 25 4. El método según la reivindicación 2, en el que las células han sido transformadas con una construcción de expresión que comprende dicho promotor unido operativamente a dicho gen.
5. El método según la reivindicación 2, en el que el promotor es un promotor de xilanasas procedente de *Trichoderma reesei* o un promotor del gen de la celulasa.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, en el que el promotor es el promotor *cbh 1*, *cbh 2*, *eg1*, *eg2*, *eg3*, *eg5*, *xln1* o *xln2* de *Trichoderma reesei*.
7. El método según la reivindicación 4, en el que la proteína es una proteína heteróloga.
8. El método según la reivindicación 7, en el que la proteína heteróloga se elige entre el grupo que consiste en hormonas, enzimas, factores de crecimiento, citocinas y anticuerpos.
9. El método según la reivindicación 2, en el que la célula es un hongo filamentoso.
- 35 10. El método según la reivindicación 9, en el que el hongo se elige entre el grupo que consiste en *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Engothia*, *Mucor*, *Cochliobolus* y *Pyncularia*.
11. El método según la reivindicación 10, en el que el hongo es *Trichoderma reesei*.
12. El método según la reivindicación 10, en el que el hongo es *Penicillium funiculosum*.
- 40 13. El método según la reivindicación 2, en el que la célula es una bacteria.
14. El método según la reivindicación 13, en el que la bacteria se elige entre el grupo que consiste en *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Bacillus* y *Cellulomonas*.
15. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el preparado de celulasa completa es de aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 10 g/L de proteína.

16. El método según la reivindicación 15, en el que el preparado de celulasa completa es de aproximadamente 5 g/L de proteína.
17. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la solución se incuba durante un tiempo entre 8 horas y 500 horas.
- 5 18. El método según la reivindicación 17, en el que la solución se incuba durante un tiempo entre 48 horas y 72 horas.
19. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el preparado de celulasa completa es inmovilizado.
- 10 20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el preparado de celulasa completa contiene una beta-glucosidasa sobreexpresada en relación con el nivel nativo.
21. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 20, en el que dicha alimentación inductora se añade a dicho cultivo de células en el modo de lote alimentado.
22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 21, en el que dicho cultivo de células se cultiva bajo condiciones de limitación de carbono.

15

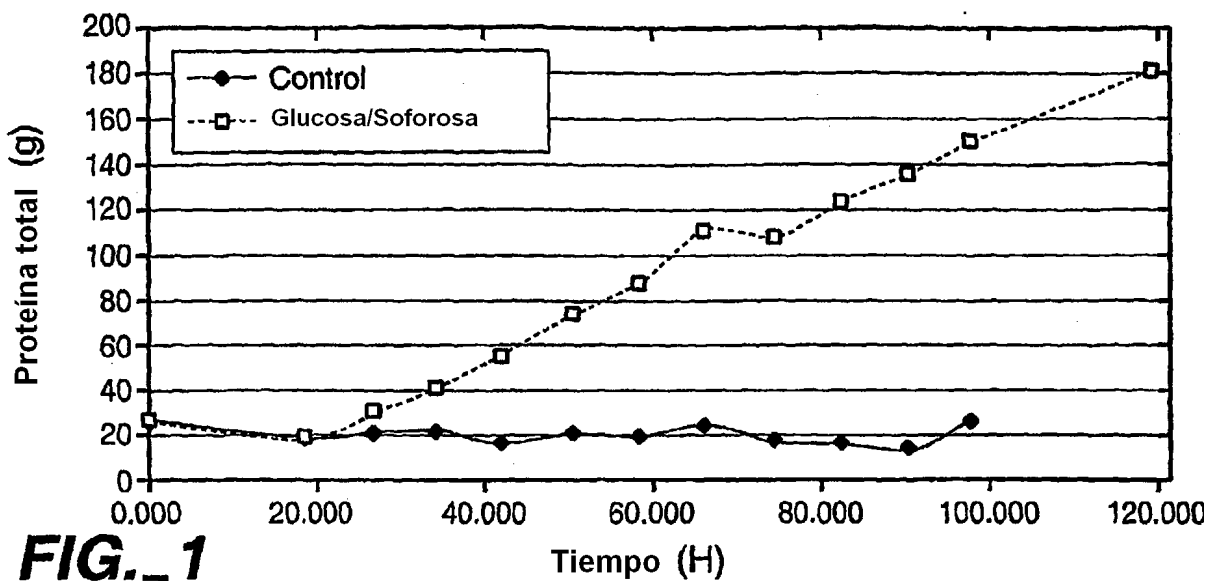


FIG. 1

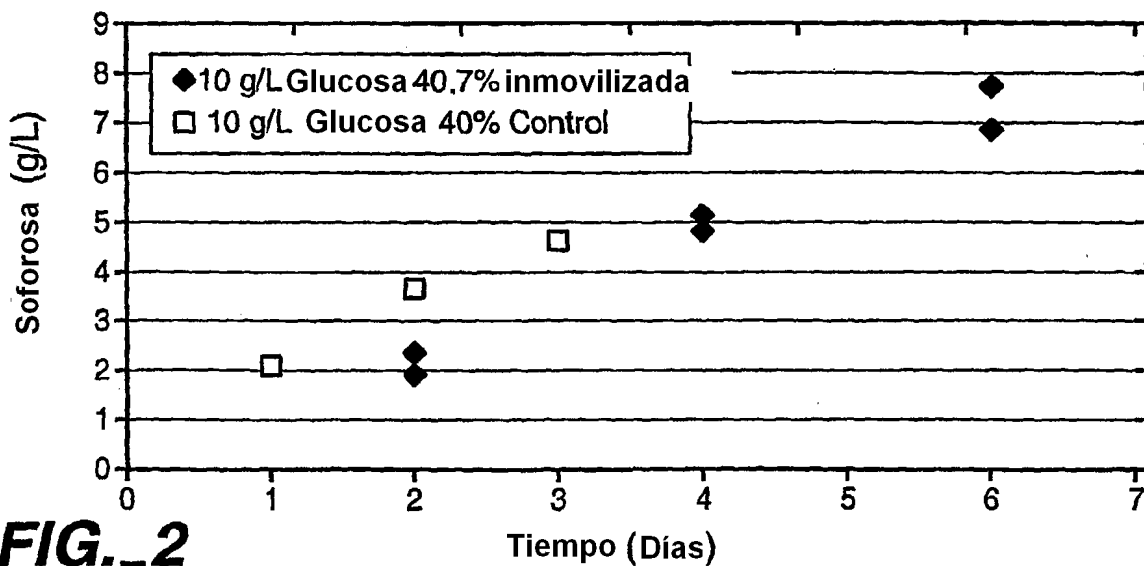


FIG. 2

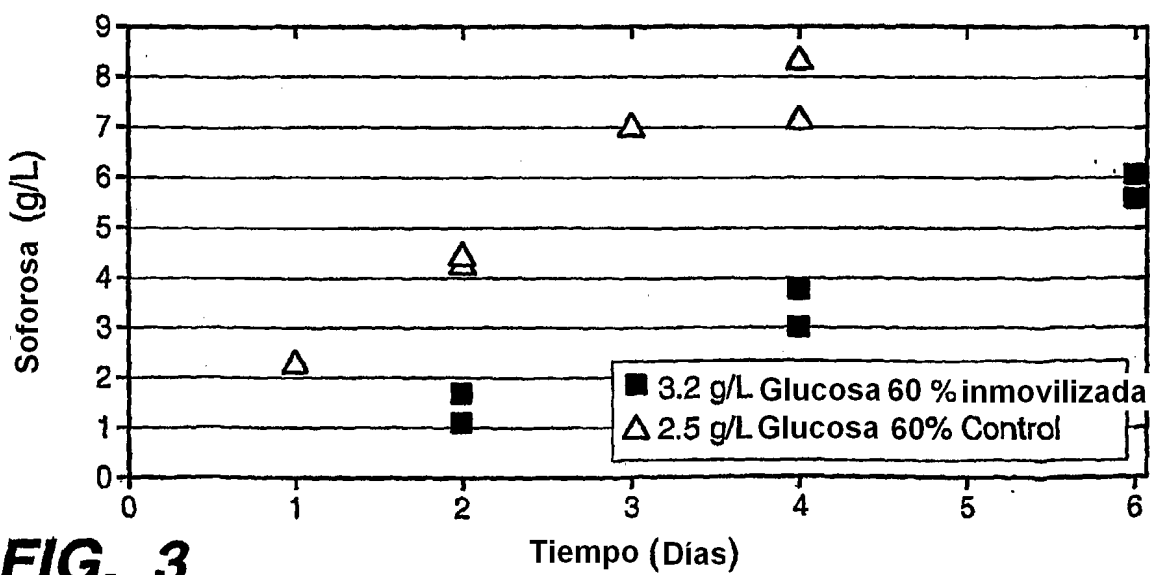


FIG. 3

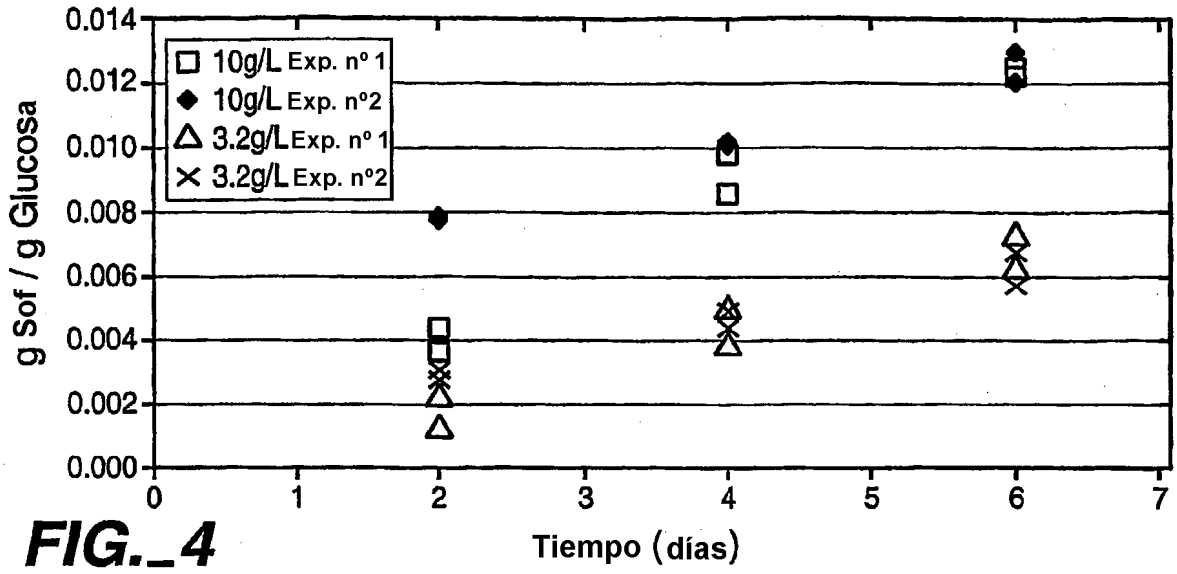


FIG. 4

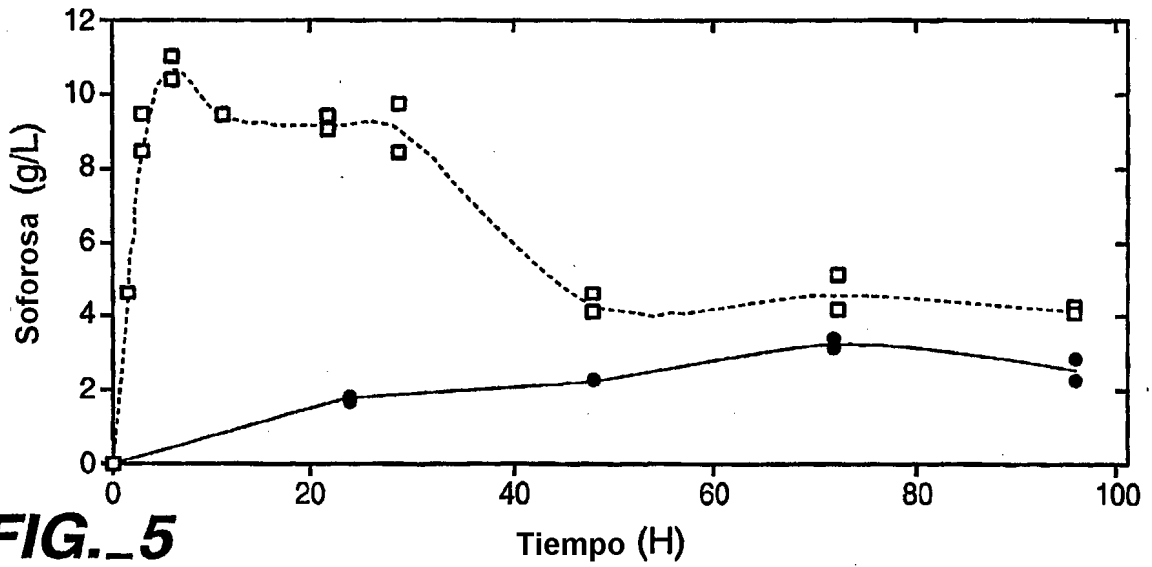


FIG. 5

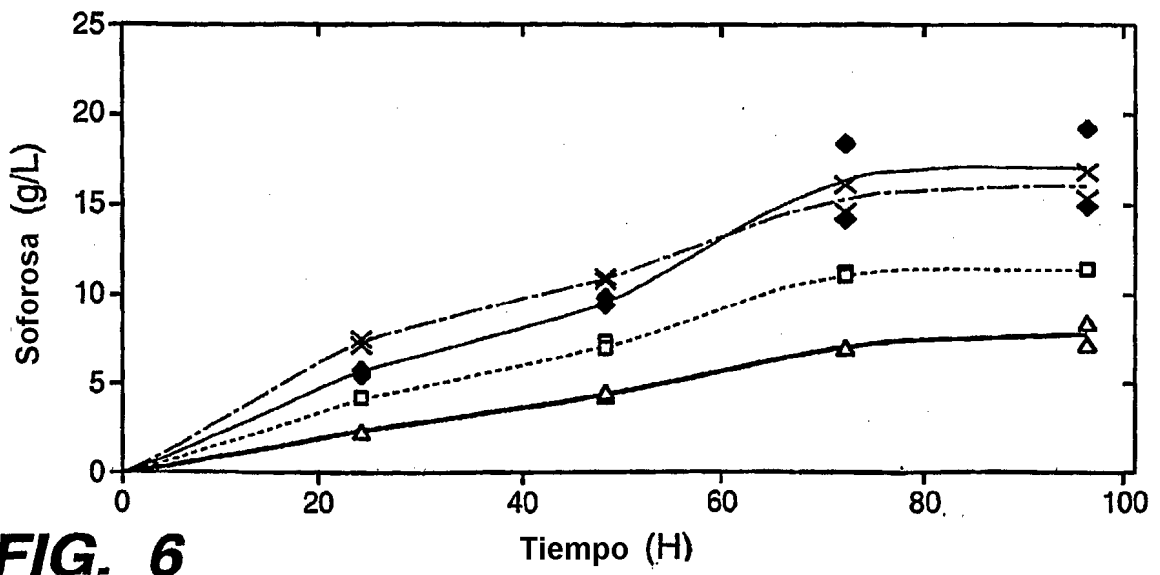


FIG. 6