(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 593 613**

(51) Int. CI.:

C08B 37/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2011 PCT/EP2011/065642**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032154**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11764126 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2614088**

(54) Título: **Proceso para la producción de ácido hialurónico en Escherichia coli o Bacillus subtilis**

(30) Prioridad:

09.09.2010 IT MI20101642

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2016

(73) Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3A
35031 Abano Terme (PD), IT

(72) Inventor/es:

CORSA, VINCENZA;
NEGRO, ALESSANDRO;
VACCARO, SUSANNA y
MESSINA, LUCIANO

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de ácido hialurónico en Escherichia coli o Bacillus subtilis

Objetivo de la invención

La presente invención describe un método para la producción de ácido hialurónico (HA) en *Bacillus subtilis* a través de vectores de plásmido en donde el gen está bajo el control del promotor fuerte Pgrac, y un sistema para la selección de cepas bacterianas estables, para la producción de altos niveles de HA.

Campo de la invención

El ácido hialurónico es un polisacárido lineal natural, que consiste en la alternancia de ácido β-1-4 D-glucurónico y β-1-3 N-acetil glucosamina. El ácido hialurónico es parte de la familia de glicosaminoglicanos, y puede alcanzar el peso molecular de 107 Da, con aprox. 300000 unidades repetitivas de sacárido. Se distribuye ampliamente en la matriz extracelular de tejido conectivo y en el epitelio de los organismos eucariotas, donde se localiza en la superficie celular, pero además puede sintetizarse en algunos organismos procariotas, tales como los de la familia *Streptococcus*. Los glicosaminoglicanos son lubricantes ideales de articulaciones, pero además desempeñan muchos otros roles funcionales en la reparación, adherencia, desarrollo de tejidos, motilidad celular, cáncer y angiogénesis. Los productos basados en ácido hialurónico se han desarrollado sobre la base de estas características importantes, y se usan en ortopedia, reumatología, y dermatología.

Las fuentes naturales más comunes de HA incluyen crestas de gallo, el material clásico del que se extrae HA, y algunas bacterias, especialmente las que pertenecen a la familia *Streptococcus*. Todas estas diferentes fuentes presentan numerosos inconvenientes: el ácido hialurónico obtenido a partir de crestas de gallo puede, por ejemplo, causar alergias en los seres humanos, ya que es de origen aviar, mientras que el HA de fuentes bacterianas debe estar libre de todas las toxinas presentes normalmente en aquellas bacterias que pueden causar posiblemente graves reacciones inflamatorias/inmunes. Los procesos industriales actuales de purificación de HA, por lo tanto comprenden muchas diferentes etapas, con el consiguiente aumento en los costos finales de fabricar la materia prima. Por consiguiente, existe una necesidad muy sentida de fuentes alternativas que eliminen todos los eventos adversos descritos, yal mismo tiempo mantengan costos de fabricación razonables. En los últimos años, las vías de biosíntesis para la síntesis de ácido hialurónico se han aclarado en detalle en numerosos organismos. Aunque los genes necesarios para la síntesis de ácido hialurónico que están presentes en los organismos eucariotas se distribuyen por todo el genoma, en los sistemas bacterianos dichos genes frecuentemente están presentes y organizados en operones. Por ejemplo, en Streptococcus, equi el operón de ácido hialurónico comprende 5 genes: hasA, hasB, hasC, hasD, y hasE. A veces, sin embargo, los genes están presentes en dos operones: en *Streptococcus equisimilis* un operón con genes hasA, hasB y hasC está presente, y otro con los genes hasC, hasD y hasE. Los genes homólogos con hasB, hasC, hasD, y hasE de los estreptococos están presentes en muchos organismos, ya que sintetizan las enzimas necesarias para la síntesis de los precursores de ácido hialurónico, ácido D-glucurónico y N acetil-D glucosamina, que son además los constituyentes básicos de las paredes bacterianas. En el caso de estreptococos, la hialuronano sintasa (hasA, que está presente en la membrana plasmática) es la enzima clave para la síntesis final de ácido hialurónico, ya que realiza dos funciones: cataliza la unión de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, y transporta la cadena de ácido hialurónico recién formada fuera de la célula. El estudio de las enzimas responsables de la síntesis de ácido hialurónico ha permitido el desarrollo de sistemas recombinantes en varios organismos, tales como *Bacillus subtilis, Lactococcus lactis, Escherichia coli* y *Agrobacterium radiobacter*. El primer organismo diseñado para producir ácido hialurónico fue *B. subtilis*, a través de la clonación en su cromosoma de un operón que porta el gen hasA de *Streptococcu*s (que falta en *Bacillus*), con los genes tuaD y gtaB de *Bacillus* (que corresponden a hasB y hasC de *Streptococcus*), bajo el control de un promotor constitutivo (US2003/175902). De esta manera, una vía de biosíntesis se organizó en operones similar a la de equi de *Streptococcus*, uno de los principales productores naturales de ácido hialurónico. Sin embargo, el sistema así perfeccionado conduce a la producción industrial de un ácido hialurónico con un peso molecular de menos de 1 MDA, con muy bajos rendimientos de fabricación.

Bacillus subtilis es una bacteria grampositiva, que se clasifica como un aerobio obligado, que normalmente se encuentra en el suelo. Es capaz de formar una endospora resistente, protectora que permite que el organismo soporte condiciones ambientales extremas; las bacterias del género *Bacillus* están, por consiguiente, entre los microorganismos más extendidos en la naturaleza, con los representantes aislados del suelo y ambientes acuáticos.

De todas las especies, sólo se conocen muy pocos patógenos, que incluyen *Bacillus anthracis*, que causa el ántrax, *B. thuringiensis*, un patógeno de insectos, y *Bacillus cereus*, que causa intoxicación alimentaria. Por el contrario, *Bacillus subtilis* se considera que es un microorganismo GRAS (generalmente considerado como seguro) y, que está libre de endo/exotoxinas, se usa para la fabricación de sustancias usadas en la industria alimentaria (tanto de alimentos como bebidas), productos tales como enzimas, antibióticos e insecticidas, y en la industria de detergentes. Los intentos de usar *Bacillus subtilis* en la producción de aminoácidos tales como triptófano, histidina y fenilalanina, y vitaminas tales como biotina, ácido fólico y riboflavina, han dado resultados prometedores.

La principal fuente de especies de *Bacillus* es el suelo; *B. subtilis* es un prototrófago que crece a temperaturas mesófilas en medios sintéticos definidos (que incluyen lo mínimo), que contienen glucosa y otros azúcares como fuente de carbono.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un método para la producción de ácido hialurónico (HA) en *Bacillus subtilis* a través de vectores de plásmido en donde los genes para la síntesis de las enzimas necesarias para la producción de HA están bajo el control del promotor fuerte Pgrac, y un sistema para la selección de cepas bacterianas secretoras estables, diseñadas genéticamente, para la producción de altas cantidades de HA que tiene peso molecular promedio ponderado específico (en lo sucesivo indicado además simplemente con MW).

Durante la construcción en *E. coli* de vectores que expresan ácido hialurónico en la forma de plásmidos, se descubrió que los genes así introducidos (responsables de la síntesis de enzimas productoras de ácido hialurónico) son tóxicos para la célula cuando su control de la traducción es un promotor constitutivo fuerte. De hecho, en *E. coli* transformada con los genes hasA y tuaD, la traducción del gen de hasA solo conduce a una gran reducción en los precursores de ácido D-glucurónico requerido para la constitución de la pared bacteriana, con el resultado de que la célula muere; mientras que la traducción del gen tuaD solo genera síntesis incontrolada de ácido D-glucurónico que, mediante la acidificación de la bacteria y la privación de glucosa (su precursor), provoca su muerte. Por el contrario, la traducción de los dos genes por polimerasas bacterianas conduce a la síntesis/activación de las dos enzimas en diferentes tiempos, debido a que requieren diferentes tiempos de construcción con diferentes procedimientos y sitios de acción (por ejemplo, hasA es una proteína transmembrana con diferentes dominios de que la cruzan, por lo que se necesita un tiempo mucho más largo para su síntesis y correcto plegamiento que para la síntesis/activación de la enzima tuaD). La célula sólo puede sobrevivir cuando las cantidades equilibradas de las enzimas precursoras y la enzima necesaria para la síntesis de ácido hialurónico están presentes. En este caso, el ácido D-glucurónico en exceso, que es tóxico a altos niveles en la célula, se usa por la hialuronano sintasa (hasA) que, mediante la combinación con glucosamina, la incorpora en el ácido hialurónico naciente y lo exporta de la célula, lo que mantiene así la célula viva.

El solicitante ha encontrado ahora sorprendentemente que aunque tanto hasA como hasB (tuaD) son necesarias para la síntesis de ácido hialurónico, es esencial para los dos genes funcionar conjuntamente, lo que deja la célula el tiempo requerido para:

- producir ácido D-glucurónico en niveles no tóxicos y
- activar la transcripción del gen hasA de tal manera que este último es capaz de disponer de los altos niveles de ácido D-glucurónico en la medida que se acumulan progresivamente en la célula.

En la presente invención, los problemas descritos anteriormente han sido resueltos al:

- colocar los genes del plásmido bajo el control de un promotor inducible, Pgrac, que usa el represor lac;
- mejorar un sistema de selección de cepas de *B. subtilis* secretoras diseñadas genéticamente, estables, viables, en donde las enzimas hasA y tuaD están presentes en cantidades "equilibradas", por lo tanto no tóxicas.

Por tanto, es objeto de la presente invención un proceso para la producción de ácido hialurónico en *Bacillus subtilis*, que comprende los siguientes etapas:

(a) cultivar las células huésped bacterianas de *Bacillus subtilis* transformadas con el sistema grac-lac, en condiciones adecuadas para la producción de ácido hialurónico, y en presencia de isopropil-β-tio-galactopiranósido (IPTG) como inductor, en donde dichas células huésped bacterianas se caracterizan por estar transformadas con:

(i) al menos un vector de plásmido episómico que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa en tándem, bajo el control del promotor fuerte inducible Pgrac que usa el represor lac, o
(ii) al menos un vector de plásmido episómico que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa, y una secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa, bajo el control del promotor fuerte inducible Pgrac que usa el represor lac;

(b) recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo;

en donde dichas células huésped bacterianas de *Bacillus subtilis* transformadas con el vector de plásmido (i) o (ii) capaces de producir ácido hialurónico de la etapa a) se preseleccionan en la placa en gradiente de IPTG.

El solicitante usó *B. subtilis* para su transformación con el plásmido episómico que contiene los genes de la síntesis de HA, ya que presenta varias ventajas como huésped para la expresión de ADN heterólogo:

- el HA producido se secreta fácilmente;
- está libre de exotoxinas y endotoxinas, a diferencia de las bacterias gram-negativas.

Preferentemente, dichas células huésped bacterianas de *B. subtilis* pertenecen a las cepas WB800N o 1012.

Particularmente, cuando se usan células huésped bacterianas de *B. subtilis*, el plásmido episómico (i) o (ii) además comprende una secuencia que codifica para el represor lac.

El sistema grac-lac transferido a *B. subtilis* con el plásmido episómico, controla la expresión de los genes responsables de la síntesis de la vía de biosíntesis de HA (clonado en el mismo plásmido episómico), y garantiza muy alta actividad y selectividad de la transcripción génica, lo que conduce a alta producción de las proteínas recombinantes requeridas para la síntesis de ácido hialurónico. El rendimiento final del producto deseado será muy alto, mucho más alto que el obtenido con *B. subtilis*, donde el sistema del operón se clona en el cromosoma de la bacteria y está bajo el control de promotores constitutivos no inducibles.

De hecho, el sistema descrito anteriormente es inducible: se introduce artificialmente en la bacteria y se activa por el solicitante mediante la adición de sustancias tales como IPTG (isopropiltiogalactósido) en cantidades de entre 0.005 y 10 mM, preferentemente de entre 0.01 y 5 mM, y con mayor preferencia entre 0.4 y 1 mM.

El sistema grac-lac comprende el promotor Pgrac con la secuencia del gen lacI para la síntesis no inducible de la proteína represora lac. Pgrac es un promotor artificial que comprende el promotor groE, operador lacO y un sitio de unión al ribosoma. IPTG (cuando se añade) determina la separación de la proteína represora lac del sitio operador lacO, de modo que la polimerasa de *B. subtilis* puede reconocer el promotor groE y comenzar la transcripción de los genes hasA y tuaD.

De esta forma, mediante la modulación con IPTG la inducción del sistema descrito anteriormente, el solicitante puede controlar la síntesis del proceso completo de biosíntesis para la producción de HA y obtener pesos moleculares promedio ponderados deseados, comprendidos en un intervalo de a partir de 100 KD hasta por encima de 2 MD, con altos rendimientos de HA. Más particularmente, cuando el proceso de acuerdo con la invención usa células huésped bacterianas de *B. subtilis* y el tiempo de fermentación está comprendido de 80 a 160 horas, es posible obtener HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo 100-500 kD; cuando el tiempo de fermentación está comprendido de 40 a 80 horas, es posible obtener HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo 500-1000 KD; cuando el tiempo de fermentación está comprendido de 12 a 40 horas, es posible obtener HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en la intervalo $1x10^6$-$2x10^6$ D.

En una modalidad preferida de la presente invención, la secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa (hasA) se obtiene de una cepa de *Streptococcus*, preferentemente de *Streptococcus zooepidemicus*, y las secuencias que codifican para las enzimas UDP-glucosa deshidrogenasa (hasB o tuaD), UDP- glucosa pirofosforilasa (hasC o gtaB) y glucosa 6 fosfato isomerasa (hasE o pgi), se derivan de *B. subtilis*.

De acuerdo con una modalidad particularmente preferida de la presente invención, las secuencias que codifican para las enzimas hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa, incluyen la secuencia Shine-Dalgarno aguas arriba.

Aún con mayor preferencia, dicho vector de plásmido (i) comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se define en la sec. con núm. de ident.: 1.

La purificación posterior del HA secretado será extremadamente simple, con el resultado de que el proceso de producción industrial será mucho más barato que el proceso de acuerdo con el estado de la técnica.

Un objeto adicional de la presente invención son vectores de plásmidos que contienen los dos genes hasA y tuaD o los cuatro genes hasA, tuaD, gtaB y pgi (correspondiente a hasE), preferentemente vectores de plásmidos con dos genes hasA y tuaD, bajo el control de un promotor fuerte inducible Pgrac, que permiten la producción de ácido hialurónico con altos rendimientos de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. En una modalidad particularmente preferida de la presente invención, dicho vector de plásmido también incluye una secuencia que codifica para el represor lac. Preferentemente, dicha secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa es el gen hasA de *Streptococcus zooepidemicus* y dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa es el gen tuaD de *Bacillus subtilis*. En una forma particularmente preferida, el vector de plásmido comprende o consiste en la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, las secuencias que codifican para las enzimas hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa, incluyen la secuencia Shine-Dalgarno aguas arriba. Estos vectores pueden construirse además para contener cualquier otro gen relacionado con la biosíntesis de ácido hialurónico. A diferencia de los que están disponibles hasta la fecha, el plásmido de partida es pequeño, lo que permite el diseño de toda la vía de biosíntesis del ácido hialurónico (es decir, los dos genes hasA y tuaD o los cuatro genes

hasA, tuaD, gtaB y pgi) en un único plásmido, que se llama pHT01hasAtuaD o pHT01hasAtuaDgtaBpgi en la presente, lo que hace la invención descrita económicamente ventajosa y exitosamente aplicable a escala industrial. Un objeto adicional de la presente invención es por consiguiente el plásmido pHT01hasAtuaD y el plásmido pHT01hasAtuaDgtaBpgi. Para la síntesis de HA de alto rendimiento con el alto peso molecular promedio ponderado deseado, el solicitante ha demostrado que se prefiere el diseño de *B. subtilis* con plásmido pHT01hasAtuaD.

La presente invención también se refiere a un método y sistema relativo para la producción/construcción de cepas bacterianas, transformadas con el plásmido que contiene toda la vía de biosíntesis del ácido hialurónico, y la selección de cepas bacterianas estables, viables, que se replican y secretan HA.

Dicho método comprende las siguientes etapas:

- Clonar el gen tuaD (UDP-glucosa deshidrogenasa) de *Bacillus Subtilis*,
- Clonar el gen hasA (hialuronano sintasa) de *Streptococcus zooepidemicus*
- Construir el plásmido pGEM4hasA y subsecuentemente, el plásmido pHT01hasA
- Construir el plásmido con el gen tuaD a continuación de hasA
- Construir el plásmido pHT01hasAtuaD, que se referirá como pBS5
- Transformar el plásmido pBS5 en *Bacillus subtilis*
- Seleccionar células secretoras de ácido hialurónico a través de gradiente de IPTG
- Seleccionar células estables, viables y secretoras.

La presente invención se describirá ahora a manera de ejemplo pero no de limitación, de acuerdo con modalidades preferidas, con particular referencia a las figuras adjuntas, en donde:

La Figura 1 muestra una comparación en placas entre el crecimiento de las células de *E. coli* TOP10, que incorporan el plásmido pHT01 (control) y las células de *E. coli* TOP10, que incorporan pBS5 (hasA tuaD);
La Figura 2 muestra el análisis en gel de la expresión del gen tuaD en *E.coli BL21 DE3*;
La Figura 3 ilustra el mapa del vector pHT01 que comprende el promotor Pgrac que consiste en el promotor groE, el operador lacO y la secuencia gsB SD; el origen de replicación ColE1; AmpR gen de resistencia a ampicilina; gen lacI (represor lacI); y CmR gen de resistencia a cloranfenicol;
La Figura 4 muestra el análisis en gel de electroforesis de la expresión constitutiva de hialuronano sintasa (Estrept) en *E. coli*; la proteína codificada designada seHAS es de 417 aminoácidos de longitud (peso molecular calculado 47,778, PI calculado 9.1) y es el miembro de la familia más pequeño identificado hasta el momento; la enzima migra anómalamente rápido en la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (aproximadamente 42000 Da);
La Figura 5 muestra la comparación entre los perfiles de expresión de HA en las cepas de *E. coli* TOP10 pBS5 (hasA tuaD) y TOP10 pHT01 (control) a través del análisis de carbazol del ácido glucurónico a 530 nm;
La Figura 6 muestra la comparación en placas entre la expresión de ácido glucurónico en cepas de *Bacillus subtilis* WB800N y 1012 transformadas con pBS5; cuando las bacterias se siembran en presencia de IPTG 1 mM, ellas mueren debido a que tuaD expresada en altas cantidades en *B. subtilis* es tóxico;
La Figura 7 muestra la expresión de ácido glucurónico en *Bacillus subtilis* en placas en donde las colonias grandes y translúcidas producen HA;
La Figura 8 muestra los resultados de los ensayos en placas para verificar la estabilidad del plásmido después de 24 horas de crecimiento celular en presencia de IPTG y sacarosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol.

Los siguientes ejemplos describen las diversas etapas requeridas para la modalidad del proceso de producción de HA de acuerdo con la presente invención, a manera de ejemplo pero no de limitación.

Ejemplo 1

Clonación del gen tuaD (UDP-glucosa deshidrogenasa) de *Bacillus Subtilis*

La secuencia del gen tuaD, que es 9300 pb de largo en *B. subtilis*, está presente en las bases de datos como el número de acceso AF015609; codifica para el operón que conduce a la síntesis de ácido teicurónico y comprende 8 genes, tuaABCDEFGH. En nuestro caso, el gen de interés tuaD cae entre las bases 3582-4984 pb. El análisis de software para enzimas de restricción indica que los sitios de restricción ClaI, EcoRI, PstI, HindIII y SphI están presentes, y por lo tanto no pueden usarse para la clonación. El codón de inicio no es una metionina sino una valina; en la presente invención se sustituyó con el codón para metionina, que traduce la proteína mucho más eficientemente. Dos cebadores de oligonucleótidos sintetizados con la siguiente secuencia se usaron para recuperar la siguiente secuencia:

5' atgaaaaaatagctgtcattggaacag 3' (sec. con núm. de ident.:2) y 5'ttataaattgtcgttcccaagtct 3' (sec. con núm. de ident.:3)

Se obtuvo el ADN genómico de *B. subtilis* (cepa 168) con el kit de extracción de Qiagen. Con 32 ciclos de PCR, mediante el uso del ADN de *B. subtilis* como molde y los dos oligonucleótidos mencionados, se obtuvo un amplificado del peso molecular esperado. El amplificado obtenido se ensayó para determinar la presencia de la enzima de restricción EcoRI. Después de cortar con esta enzima en gel de agarosa al 1 %, dos bandas de ADN que pesan 470 pb

y 920 pb están presentes, que corresponde a lo esperado. Para clonar el gen tuaD en un vector de expresión, se sintetizaron otros dos oligonucleótidos con la siguiente secuencia:

5' gctggatccatgaaaaaatagctgtcattgg 3' (sec. con núm. de ident.:4) y
5' ctcgctagcttataaattgacgcttcccaag 3' (sec. con núm. de ident.:5)

para insertar dicha secuencia entre los sitios de restricción *BamHI* y *NheI* en el vector de expresión, el plásmido pRSETB (INVITROGEN).

Una secuencia Shine-Dalgarno (SD) necesita introducirse en el gen tuaD aguas arriba del extremo 5' del gen para permitir el reconocimiento eficiente por la ARN polimerasa bacteriana. Para este fin, el ADN se amplificó con los oligonucleótidos siguientes:

5' cgacatatgaaaaaatagctgtcattgg 3' (sec. con núm. de ident.:6) y
5' ctcgctagcttataaattgacgcttcccaag 3' (sec. con núm. de ident.:7).

Ellos contienen en 5' dos sitios de restricción *NdeI* y *NheI* que permiten su clonación en el vector pRSET B entre los mismos sitios. De esta manera, una secuencia SD particularmente eficiente, que es necesaria para la ARN polimerasa para sintetizar la proteína, está presente aguas arriba del sitio de restricción NdeI del plásmido pRSET B. El sitio de restricción XbaI, que se requerirá para las clonaciones posteriores, está además presente incluso antes de dicha secuencia. El vector creado, pRSET B, por lo tanto, se llama pRSEtuaD.

Así, en este plásmido, la secuencia que codifica para tuaD cae entre los sitios de restricción *NdeI* y *NheI*; el sitio de restricción XbaI, que es necesario para la clonación posterior, está presente antes y aguas arriba de dicho plásmido, y otros sitios de restricción, que incluyen *BaniHI-- BglII --XhoI*, están presentes detrás del gen tuaD.

El diagrama a continuación resume los sitios de interés presentes en el plásmido pRSEtuaD

XbaI-- NdeI----------tuaD---------- NheI -BamHI-- BglI -XhoI

El plásmido descrito es un vector de expresión que funciona además en *E. coli*, debido a que el gen está bajo el control del promotor T7; si este se transforma en las células bacterianas BL21 DE3, que son capaces de transcribir la ARN polimerasa de T7, este por lo tanto les permite expresar el gen tuaD. Después de la inducción con IPTG 1 mM, las células transfectadas son capaces de producir la proteína del peso molecular esperado, pero no ácido hialurónico. La construcción es particularmente eficiente debido a que el nivel de expresión es muy alto. Los tamaños de las colonias que portan plásmido pRSEtuaD son muy pequeñas en comparación con las células control (Figura 1), lo que demuestra la toxicidad del gen tuaD. Esta clonación es difícil precisamente porque es aparentemente difícil para las colonias crecer; el nivel particularmente alto de expresión de esta proteína probablemente reduce drásticamente la glucosa disponible para la síntesis incontrolada de ácido D-glucurónico, lo que priva así a la célula de la fuente de energía principal. Las células en las que la síntesis de tuaD se induce con IPTG no son capaces de sobrevivir durante un largo tiempo, por lo que el producto del gen es tóxico.

En conclusión, el gen tuaD se aisló y clonó en un plásmido y la secuencia resultó correcta. El gen expresado en *E. coli* es capaz de producir una proteína del peso molecular esperado correspondiente a la descrita para tuaD (54 kDa, Figura 2); sin embargo, en ausencia de hialuronano sintasa, estas células son incapaces de producir importantes cantidades de ácido hialurónico, y la consiguiente acumulación de glucuronato es tóxico para la célula.

Ejemplo 2

Clonación del gen hasA (hialuronano sintasa) de *Streptococcus zooepidemicus*

La secuencia del gen de hialuronano sintasa está presente en las bases de datos con número de acceso AY173078, y es 3552 pb de largo; la secuencia que codifica para la proteína está entre las bases 1 y 1254. Los sitios de restricción *HindIII* y *StuI* están presentes en esta secuencia, y por lo tanto no pueden usarse para la clonación, pero pueden usarse para verificar la clonación. Dos oligonucleótidos para usar con la PCR se diseñaron y sintetizaron para recuperar la secuencia codificante:

5 'atgagaacattaaaaaacctcataac 3' (sec. con núm. de ident.: 8) y 5' taataatttttacgtgttccccag 3' (sec. con núm. de ident.: 9)

El ADN genómico de la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* se recuperó con el kit de extracción de Qiagen. La secuencia codificante de 1254 pb se recuperó con PCR. El amplificado esperado de las dimensiones correctas se controló con la enzima de restricción *HindIII*, y dio lugar a dos bandas de aprox. 100 pb y 1150 pb que corresponden al corte esperado.

Ejemplo 3

Construcción del plásmido de expresión para *Bacillus subtilis* pHTO1hasA

Para clonar dicho gen en el vector de expresión pHT01 (Mobitec - Figura 3) que contiene el sistema promotor del gen-represor grac-lac, la secuencia anteriormente mencionada debe clonarse entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI*. Otros dos oligonucleótidos con la siguiente secuencia se crearon para este fin:

5' ggaggatccatgagaacattaaaaaacctcat 3' (sec. con núm. de ident.: 10) y 5' cagtctagattataataattttacgtgtcc 3' (sec. con núm. de ident.: 11)

En el primer oligonucleótido, se creó el sitio de restricción *BamHI* cerca de 5', mientras que en el segundo oligonucleótido, se creó el sitio de restricción *XbaI*, de nuevo en 5'. El amplificado obtenido a través de estos dos oligonucleótidos se clonó en el plásmido pGEM4Z (PROMEGA) entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI* para dar el plásmido pGEM4hasA.

La secuencia de ADN entre dichos dos sitios de restricción se analizó con un secuenciador ABI 7000, y resultó correcta.

HindIII-BamHI ----------hasA----------XbaI-SalI

El plásmido se comprobó para la expresión de la proteína recombinante en *E. coli*, y presentó un peso molecular de aprox. 42 kDa (que está de acuerdo con el peso informado para esa proteína en la bibliografía, aunque tiene un peso molecular teórico de 47.778 kDa, Figura 4).

Para clonar dicha secuencia entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI* del vector pHT01, el plásmido pGEM4hasA se cortó en los sitios *BamHI* y *XbaI,* y la banda de 1240 pb se clonó en los mismos sitios como plásmido pHT01 para obtener el plásmido pHT01hasA. Este plásmido es incapaz de producir cantidades significativas de ácido hialurónico debido a que carece del gen tuaD. Esto demuestra que la presencia de hasA sola no es suficiente para expresar cantidades significativas de HA.

Ejemplo 4

Construcción del plásmido de expresión pHT01hasA-tuaD de *Bacillus subtilis*

Con esta construcción, el gen hasA se coloca en tándem con el gen tuaD bajo el control del promotor inducible Pgrac presente en el plásmido pHT01 (Mobitec). El plásmido pGEM4hasA (descrito en el ejemplo anterior) se usó como vector para este propósito, puesto que ya contiene el gen hasA. Dicho plásmido se cortó en los sitios *XbaI* y *SalI*, mientras que la secuencia del gen tuaD se cortó por el plásmido pRESEtuaD en los sitios *XbaI* y *XhoI* y después se clonó en los mismos sitios (*XhoI* y *SalI* son compatibles).

pGEM4hasA
HindIII-BamHI ----------hasA----------XbaI-SalI
pRSEtuaD
XbaI-- NdeI----------tuaD---------- NheI -BamHI--BglI -XhoI

obteniendo esta secuencia:

HindIII-BamHI ---------hasA--------- XbaI--NdeI--------tuaD----------NheI -BamHI--BglI-XhoI

En este punto el gen hasA está en tándem con el gen tuaD; el fragmento *BamHI* ---- *NheI*, que se obtiene a partir del plásmido por corte con dichas enzimas de restricción, contiene el gen hasA y el gen tuaD en tándem. El fragmento se clonó después en el vector pHT01 entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI* (XbaI es compatible con *NheI*), lo que da lugar al plásmido pBS5, la secuencia completa, controlada del cual se expone más abajo:

```
      0  TTAAGTTATTGGTATGACTGGTTTTAAGCGCAAAAAAAGTTGCTTTTTCGTACCTATTAA
     60  TGTATCGTTTTAGAAAACCGACTGTAAAAAGTACAGTCGGCATTATCTCATATTATAAAA
    120  GCCAGTCATTAGGCCTATCTGACAATTCCTGAATAGAGTTCATAAACAATCCTGCATGAT
    180  AACCATCACAAACAGAATGATGTACCTGTAAAGATAGCGGTAAATATATTGAATTACCTT
    240  TATTAATGAATTTTCCTGCTGTAATAATGGGTAGAAGGTAATTACTATTATTATTGATAT
    300  TTAAGTTAAACCCAGTAAATGAAGTCCATGGAATAATAGAAAGAGAAAAAGCATTTTCAG
    360  GTATAGGTGTTTTGGGAAACAATTTCCCCGAACCATTATATTTCTCTACATCAGAAAGGT
    420  ATAAATCATAAAACTCTTTGAAGTCATTCTTTACAGGAGTCCAAATACCAGAGAATGTTT
    480  TAGATACACCATCAAAAATTGTATAAAGTGGCTCTAACTTATCCCAATAACCTAACTCTC
    540  CGTCGCTATTGTAACCAGTTCTAAAAGCTGTATTTGAGTTTATCACCCTTGTCACTAAGA
    600  AAATAAATGCAGGGTAAAATTTATATCCTTCTTGTTTTATGTTTCGGTATAAAACACTAA
    660  TATCAATTTCTGTGGTTATACTAAAAGTCGTTTGTTGGTTCAAATAATGATTAAATATCT
    720  CTTTTCTCTTCCAATTGTCTAAATCAATTTTATTAAAGTTCATTTGATATGCCTCCTAAA
    780  TTTTTATCTAAAGTGAATTTAGGAGGCTTACTTGTCTGCTTTCTTCATTAGAATCAATCC
    840  TTTTTTAAAAGTCAATATTACTGTAACATAAATATATATTTTAAAAATATCCCACTTTAT
    900  CCAATTTTCGTTTGTTGAACTAATGGGTGCTTTAGTTGAAGAATAAAGACCACATTAAAA
    960  AATGTGGTCTTTTGTGTTTTTTTAAAGGATTTGAGCGTAGCGAAAAATCCTTTTCTTTCT
   1020  TATCTTGATAATAAGGGTAACTATTGCCGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACT
   1080  ATGGCGTGCTGCTAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG
   1140  GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA
                                                              EcoRI
   1200  AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTC
```

```
1260  GAGCTCAGGCCTTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGA
1320  AACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGT
1380  ATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTT
1440  CACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCG
1500  AAAATCCTGTTTGATGGTGGTTGACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTC
1560  GTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCAT
1620  TGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATT
1680  CAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGC
1740  TATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGC
1800  CGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAG
1860  ATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGT
1920  CTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAAT
1980  GGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAG
2040  ATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCAC
2100  GCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTG
2160  CAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTG
2220  TGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGT
2280  TTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACC
2340  GGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCATCAAAATCGTCTCCCTCCGTTT
2400  GAATATTTGATTGATCGTAACCAGATGAAGCACTCTTTCCACTATCCCTACAGTGTTATG
2460  GCTTGAACAATCACGAAACAATAATTGGTACGTACGATCTTTCAGCCGACTCAAACATCA
2520  AATCTTACAAATGTAGTCTTTGAAAGTATTACATATGTAAGATTTAAATGCAACCGTTTT
2580  TTCGGAAGGAAATGATGACCTCGTTTCCACCGGAATTAGCTTGGTACCAGCTATTGTAAC
2640  ATAATCGGTACGGGGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGC
2700  GTGAAAAATTTTTTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATT
                                                  BamHI
2760  GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAATTAAAGGAGGAAGGATCCATGAGAACATTA
   1                                                  M  R  T  L
```

```
2820  AAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTTGGGTACTGTTGATTTACGTCAAT
   1  K  N  L  I  T  V  V  A  F  S  I  F  W  V  L  L  I  Y  V  N
                                HindIII
2880  GTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCAATTTATGGCTTTTTGCTGATAGCTTAC
   1  V  Y  L  F  G  A  K  G  S  L  S  I  Y  G  F  L  L  I  A  Y
2940  CTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTACAAGCCATTTAAGGGAAGGGCTGGGCAA
   1  L  L  V  K  M  S  L  S  F  F  Y  K  P  F  K  G  R  A  G  Q
3000  TATAAGGTTGCAGCCATTATTCCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACC
   1  Y  K  V  A  A  I  I  P  S  Y  N  E  D  A  E  S  L  L  E  T
3060  TTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCAGAAATTTATGTTGTTGACGATGGA
   1  L  K  S  V  Q  Q  Q  T  Y  P  L  A  E  I  Y  V  V  D  D  G
3120  AGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGACACTGGTGACCTA
   1  S  A  D  E  T  G  I  K  R  I  E  D  Y  V  R  D  T  G  D  L
3180  TCAAGCAATGTCATTGTTCACCGGTCAGAAAAAAAATCAAGGAAAGCGTCATGCACAGGCC
   1  S  S  N  V  I  V  H  R  S  E  K  N  Q  G  K  R  H  A  Q  A
3240  TGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTGACCGTTGACTCAGATACTTATATC
   1  W  A  F  E  R  S  D  A  D  V  F  L  T  V  D  S  D  T  Y  I
3300  TACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACTGTTTTTGCTGCG
   1  Y  P  D  A  L  E  E  L  L  K  T  F  N  D  P  T  V  F  A  A
3360  ACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGCTTGACAGATATT
   1  T  G  H  L  N  V  R  N  R  Q  T  N  L  L  T  R  L  T  D  I
3420  CGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCCAATCCGTTACAGGTAATATTCTC
   1  R  Y  D  N  A  F  G  V  E  R  A  A  Q  S  V  T  G  N  I  L
3480  GTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCCTAACATAGATAGA
   1  V  C  S  G  P  L  S  V  Y  R  R  E  V  V  V  P  N  I  D  R
3540  TACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCCTGTAAGTATCGGTGATGACAGGTGCTTGACC
   1  Y  I  N  Q  T  F  L  G  I  P  V  S  I  G  D  D  R  C  L  T
3600  AACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAATGTATTACAGAT
   1  N  Y  A  T  D  L  G  K  T  V  Y  Q  S  T  A  K  C  I  T  D
```

```
3660  GTTCCTGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTT
   1  V  P  D  K  M  S  T  Y  L  K  Q  Q  N  R  W  N  K  S  F  F
3720  AGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTGTAGCCCTATGGACC
   1  R  E  S  I  I  S  V  K  K  I  M  N  N  P  F  V  A  L  W  T
3780  ATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTTTATTCTGTGGTGGATTTCTTTGTAGGC
   1  I  L  E  V  S  M  F  M  M  L  V  Y  S  V  V  D  F  F  V  G
3840  AATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTGGCCTTTCTGGTGATTATCTTCATTGTT
   1  N  V  R  E  F  D  W  L  R  V  L  A  F  L  V  I  I  F  I  V
3900  GCTCTTTGTCGTAATATTCACTATATGCTTAAGCACCCGCTGTCCTTCTTGTTATCTCCG
   1  A  L  C  R  N  I  H  Y  M  L  K  H  P  L  S  F  L  L  S  P
3960  TTTTATGGGGTACTGCATTTGTTTGTCCTACAGCCCTTGAAATTGTATTCTCTTTTTACT
   1  F  Y  G  V  L  H  L  F  V  L  Q  P  L  K  L  Y  S  L  F  T
                                                XbaI
4020  ATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAATTATTATAATCTAGAAATAATTTTGTT
   1  I  R  N  A  D  W  G  T  R  K  K  L  L
4080  TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAAATAGCTGTCATTGGAACAGGTTATGTA
   1                        M  K  K  I  A  V  I  G  T  G  Y  V
4140  GGACTCGTATCAGGCACTTGCTTTGCGGAGATCGGCAATAAAGTTGTTTGCTGTGATATC
   1  G  L  V  S  G  T  C  F  A  E  I  G  N  K  V  V  C  C  D  I
4200  GATGAATCAAAAATCAGAAGCCTGAAAAATGGGGTAATCCCAATCTATGAACCAGGGCTT
   1  D  E  S  K  I  R  S  L  K  N  G  V  I  P  I  Y  E  P  G  L
4260  GCAGACTTAGTTGAAAAAAATGTGCTGGATCAGCGCCTGACCTTTACGAACGATATCCCG
   1  A  D  L  V  E  K  N  V  L  D  Q  R  L  T  F  T  N  D  I  P
4320  TCTGCCATTCGGGCCTCAGATATTATTTATATTGCAGTCGGAACGCCTATGTCCAAAACA
   1  S  A  I  R  A  S  D  I  I  Y  I  A  V  G  T  P  M  S  K  T
4380  GGTGAAGCTGATTTAACGTACGTCAAAGCGGCGGCGAAAACAATCGGTGAGCATCTTAAC
   1  G  E  A  D  L  T  Y  V  K  A  A  A  K  T  I  G  E  H  L  N
4440  GGCTACAAAGTGATCGTAAATAAAAGCACAGTCCCGGTTGGAACAGGGAAACTGGTGCAA
   1  G  Y  K  V  I  V  N  K  S  T  V  P  V  G  T  G  K  L  V  Q
EcoRI
```

```
4500  TCTATCGTTCAAAAAGCCTCAAAGGGGAGATACTCATTTGATGTTGTATCTAACCCTGAA
   1  S  I  V  Q  K  A  S  K  G  R  Y  S  F  D  V  V  S  N  P  E
4560  TTCCTTCGGGAAGGGTCAGCGATTCATGACACGATGAATATGGAGCGTGCCGTGATTGGT
   1  F  L  R  E  G  S  A  I  H  D  T  M  N  M  E  R  A  V  I  G
4620  TCAACAAGTCATAAAGCCGCTGCCATCATTGAGGAACTTCATCAGCCATTCCATGCTCCT
   1  S  T  S  H  K  A  A  A  I  I  E  E  L  H  Q  P  F  H  A  P
4680  GTCATTAAAACAAACCTAGAAAGTGCAGAAATGATTAAATACGCCGCGAATGCATTTCTG
   1  V  I  K  T  N  L  E  S  A  E  M  I  K  Y  A  A  N  A  F  L
4740  GCGACAAAGATTTCCTTTATCAACGATATCGCAAACATTTGTGAGCGAGTCGGCGCAGAC
   1  A  T  K  I  S  F  I  N  D  I  A  N  I  C  E  R  V  G  A  D
4800  GTTTCAAAAGTTGCTGATGGTGTTGGTCTTGACAGCCGTATCGGCAGAAAGTTCCTTAAA
   1  V  S  K  V  A  D  G  V  G  L  D  S  R  I  G  R  K  F  L  K
4860  GCTGGTATTGGATTCGGCGGTTCATGTTTTCCAAAGGATACAACCGCGCTGCTTCAAATC
   1  A  G  I  G  F  G  G  S  C  F  P  K  D  T  T  A  L  L  Q  I
4920  GCAAAATCGGCAGGCTATCCATTCAAGCTCATCGAAGCTGTCATTGAAACGAACGAAAAG
   1  A  K  S  A  G  Y  P  F  K  L  I  E  A  V  I  E  T  N  E  K
4980  CAGCGTGTTCATATTGTAGATAAACTTTTGACTGTTATGGGAAGCGTCAAAGGGAGAACC
   1  Q  R  V  H  I  V  D  K  L  L  T  V  M  G  S  V  K  G  R  T
5040  ATTTCAGTCCTGGGATTAGCCTTCAAACCGAATACGAACGATGTGAGATCCGCTCCAGCG
   1  I  S  V  L  G  L  A  F  K  P  N  T  N  D  V  R  S  A  P  A
5100  CTTGATATTATCCCAATGCTGCAGCAGCTGGGCGCCCATGTAAAAGCATACGATCCGATT
   1  L  D  I  I  P  M  L  Q  Q  L  G  A  H  V  K  A  Y  D  P  I
                HindIII
5160  GCTATTCCTGAAGCTTCAGCGATCCTTGGCGAACAGGTCGAGTATTACACAGATGTGTAT
   1  A  I  P  E  A  S  A  I  L  G  E  Q  V  E  Y  Y  T  D  V  Y
5220  GCTGCGATGGAAGACACTGATGCATGCCTGATTTTAACGGATTGGCCGGAAGTGAAAGAA
   1  A  A  M  E  D  T  D  A  C  L  I  L  T  D  W  P  E  V  K  E
5280  ATGGAGCTTGTAAAAGTGAAAACCCTCTTAAAACAGCCAGTCATCATTGACGGCAGAAAT
   1  M  E  L  V  K  V  K  T  L  L  K  Q  P  V  I  I  D  G  R  N
```

```
5340  TTATTTTCACTTGAAGAGATGCAGGCAGCCGGATACATTTATCACTCTATCGGCCGTCCC
   1  L  F  S  L  E  E  M  Q  A  A  G  Y  I  Y  H  S  I  G  R  P
5400  GCTGTTCGGGGAACGGAACCCTCTGACAAGTATTTTCCGGGCTTGCCGCTTGAAGAATTG
   1  A  V  R  G  T  E  P  S  D  K  Y  F  P  G  L  P  L  E  E  L
                                      Nhe/XbaI      SmaI
5460  GCTAAAGACTTGGGAAGCGTCAATTTATAAGCTAGAGTCGACGTCCCCGGGGCAGCCCGC
   1  A  K  D  L  G  S  V  N  L
5520  CTAATGAGCGGGCTTTTTTCACGTCACGCGTCCATGGAGATCTTTGTCTGCAACTGAAAA
5580  GTTTATACCTTACCTGGAACAAATGGTTGAAACATACGAGGCTAATATCGGCTTATTAGG
5640  AATAGTCCCTGTACTAATAAAATCAGGTGGATCAGTTGATCAGTATATTTTGGACGAAGC
5700  TCGGAAAGAATTTGGAGATGACTTGCTTAATTCCACAATTAAATTAAGGGAAAGAATAAA
5760  GCGATTTGATGTTCAAGGAATCACGGAAGAAGATACTCATGATAAAGAAGCTCTAAAACT
5820  ATTCAATAACCTTACAATGGAATTGATCGAAAGGGTGGAAGGTTAATGGTACGAAAATTA
                                          HindIII
5880  GGGGATCTACCTAGAAAGCCACAAGGCGATAGGTCAAGCTTAAAGAACCCTTACATGGAT
5940  CTTACAGATTCTGAAAGTAAAGAAACAACAGAGGTTAAACAAACAGAACCAAAAAGAAAA
6000  AAAGCATTGTTGAAAACAATGAAAGTTGATGTTTCAATCCATAATAAGATTAAATCGCTG
                                    EcoRI
6060  CACGAAATTCTGGCAGCATCCGAAGGGAATTCATATTACTTAGAGGATACTATTGAGAGA
6120  GCTATTGATAAGATGGTTGAGACATTACCTGAGAGCCAAAAAACTTTTTATGAATATGAA
6180  TTAAAAAAAAGAACCAACAAAGGCTGAGACAGACTCCAAACGAGTCTGTTTTTTTAAAAA
6240  AAATATTAGGAGCATTGAATATATATTAGAGAATTAAGAAAGACATGGGAATAAAAATAT
6300  TTTAAATCCAGTAAAAATATGATAAGATTATTTCAGAATATGAAGAACTCTGTTTGTTTT
6360  TGATGAAAAAACAAACAAAAAAAATCCACCTAACGGAATCTCAATTTAACTAACAGCGGC
6420  CAAACTGAGAAGTTAAATTTGAGAAGGGGAAAAGGCGGATTTATACTTGTATTTAACTAT
6480  CTCCATTTTAACATTTTATTAAACCCCATACAAGTGAAAATCCTCTTTTACACTGTTCCT
6540  TTAGGTGATCGCGGAGGGACATTATGAGTGAAGTAAACCTAAAAGGAAATACAGATGAAT
6600  TAGTGTATTATCGACAGCAAACCACTGGAAATAAAATCGCCAGGAAGAGAATCAAAAAAG
```

6660 GGAAAGAAGAAGTTTATTATGTTGCTGAAACGGAAGAGAAGATATGGACAGAAGAGCAAA

6720 TAAAAAACTTTTCTTTAGACAAATTTGGTACGCATATACCTTACATAGAAGGTCATTATA

6780 CAATCTTAAATAATTACTTCTTTGATTTTTGGGGCTATTTTTTAGGTGCTGAAGGAATTG

6840 CGCTCTATGCTCACCTAACTCGTTATGCATACGGCAGCAAAGACTTTTGCTTTCCTAGTC

6900 TACAAACAATCGCTAAAAAAATGGACAAGACTCCTGTTACAGTTAGAGGCTACTTGAAAC

6960 TGCTTGAAAGGTACGGTTTTATTTGGAAGGTAAACGTCCGTAATAAAACCAAGGATAACA

7020 CAGAGGAATCCCCGATTTTTAAGATTAGACGTAAGGTTCCTTTGCTTTCAGAAGAACTTT

7080 TAAATGGAAACCCTAATATTGAAATTCCAGATGACGAGGAAGCACATGTAAAGAAGGCTT

7140 TAAAAAAGGAAAAAGAGGGTCTTCCAAAGGTTTTGAAAAAAGAGCACGATGAATTTGTTA

7200 AAAAAATGATGGATGAGTCAGAAACAATTAATATTCCAGAGGCCTTACAATATGACACAA

7260 TGTATGAAGATATACTCAGTAAAGGAGAAATTCGAAAAGAAATCAAAAAACAAATACCTA

7320 ATCCTACAACATCTTTTGAGAGTATATCAATGACAACTGAAGAGGAAAAAGTCGACAGTA

7380 CTTTAAAAAGCGAAATGCAAAATCGTGTCTCTAAGCCTTCTTTTGATACCTGGTTTAAAA

7440 ACACTAAGATCAAAATTGAAAATAAAAATTGTTTATTACTTGTACCGAGTGAATTTGCAT

7500 TTGAATGGATTAAGAAAAGATATTTAGAAACAATTAAAACAGTCCTTGAAGAAGCTGGAT

7560 ATGTTTTCGAAAAAATCGAACTAAGAAAAGTGCAATAAACTGCTGAAGTATTTCAGCAGT

7620 TTTTTTTATTTAGAAATAGTGAAAAAAATATAATCAGGGAGGTATCAATATTTAATGAGT

7680 ACTGATTTAAATTTATTTAGACTGGAATTAATAATTAACACGTAGACTAATTAAAATTTA

7740 ATGAGGGATAAAGAGGATACAAAAATATTAATTTCAATCCCTATTAAATTTTAACAAGGG

7800 GGGGATTAAAATTTAATTAGAGGTTTATCCACAAGAAAAGACCCTAATAAAATTTTTACT

7860 AGGGTTATAACACTGATTAATTTCTTAATGGGGGAGGGATTAAAATTTAATGACAAAGAA

HindIII

7920 AACAATCTTTTAAGAAAAGCTTTTAAAAGATAATAATAAAAAGAGCTTTGCGATTAAGCA

7980 AAACTCTTTACTTTTTCATTGACATTATCAAATTCATCGATTTCAAATTGTTGTTGTATC

8040 ATAAAGTTAATTCTGTTTTGCACAACCTTTTCAGGAATATAAAACACATCTGAGGCTTGT

8100 TTTATAAACTCAGGGTCGCTAAAGTCAATGTAACGTAGCATATGATATGGTATAGCTTCC

8160 ACCCAAGTTAGCCTTTCTGCTTCTTCTGAATGTTTTTCATATACTTCCATGGGTATCTCT

8220 AAATGATTTTCCTCATGTAGCAAGGTATGAGCAAAAAGTTTATGGAATTGATAGTTCCTC

8280 TCTTTTTCTTCAACTTTTTTATCTAAAACAAACACTTTAACATCTGAGTCAATGTAAGCA

8340 TAAGATGTTTTTCCAGTCATAATTTCAATCCCAAATCTTTTAGACAGAAATTCTGGACGT

8400 AAATCTTTTGGTGAAAGAATTTTTTTATGTAGCAATATATCCGATACAGCACCTTCTAAA

8460 AGCGTTGGTGAATAGGGCATTTTACCTATCTCCTCTCATTTTGTGGAATAAAAATAGTCA

8520 TATTCGTCCATCTACCTATCCTATTATCGAACAGTTGAACTTTTTAATCAAGGATCAGTC

8580 CTTTTTTTCATTATTCTTAAACTGTGCTCTTAACTTTAACAACTCGATTTGTTTTTCCAG

8640 ATCTCGAGGGTAACTAGCCTCGCCGATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTCAGGTGGCACTTT

8700 TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA

8760 TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT

8820 GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT

8880 TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG

8940 AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGA

9000 AGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCG

9060 TATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT

9120 TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG

9180 CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG

9240 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGA

9300 TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC

9360 TGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC

9420 CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC

9480 GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG

9540 CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAC

9600 CACGGCGCAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC

9660 ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT

9720 AAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC

9780 CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA

9840 AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC

9900 ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT

```
 9960  AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG

10020  CCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC

10080  AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTT

10140  ACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA

10200  GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT

10260  TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG

10320  CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA

10380  CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA

10440  CGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

10500  CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA

10560  TACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

10620  GCGCCCAATACG
```

(sec. con núm. de ident.:1)

En esta secuencia el gen hasA está presente entre las bases 2808 y 4062, y una secuencia Shine-Dalgarno (GGAGGA) está correctamente presente antes del gen para aumentar la eficiencia de la transcripción. A continuación, el gen tuaD está presente entre las bases 4105 pb a 5490 pb; aquí de nuevo, una secuencia Shine-Dalgarno eficiente (AGGAGA) está presente antes del gen. Además, el codón de inicio de valina presente en el gen tuaD se sustituyó con la metionina más eficiente. El plásmido, probado para enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*, da un patrón de restricción correcto con las siguientes bandas: 3957 pb, 1650 pb, 1522 pb, 1243 pb y 610 pb.

Este vector es capaz de expresar ácido hialurónico en *Bacillus subtilis*, y además, en *E. coli*; de hecho, la prueba de carbazol llevada a cabo por las células transfectadas con pBS5 con respecto a las células que contienen el vector sin estas secuencias, muestra la presencia de ácido glucurónico (Figura 5 - pico alrededor de 530 nm), que es uno de los constituyentes del ácido hialurónico, exclusivamente en las células diseñadas con pBS5.

El plásmido pHT01 es un vector lanzadera capaz de crecer tanto en *E. coli* como *B.subtilis*. Sin embargo, sorprendentemente se ha encontrado que el plásmido puede crecer más eficientemente en la cepa INV-1α de células de *E.coli*, que en la cepa TOP-10, que es mucho más eficiente en la transformación, ya que contiene el represor lac expresado constitutivamente.

El plásmido pBS5 contiene el promotor inducible Pgrac que usa el represor lac. Además en *E. coli*, este promotor, inducido con IPTG 1 mM, permite que las polimerasas bacterianas codifiquen para los genes aguas abajo para la síntesis de HA. Entonces, el solicitante ha obtenido la transformación de este plásmido (a) en células JM110 de *E. coli*, células bacterianas que carecen de dos genes, Dam y Dcm, que conducen a la metilación del ADN en el nivel de la secuencia de reconocimiento GATC (Dam) y CCTGG CCAGG (Dcm). Este ADN transferido a las células de *B. subtilis* es capaz de producir ácido hialurónico con un peso molecular promedio ponderado mayor que el obtenible con el ADN transferido en la cepa INV-1α de *E. coli*.

Ejemplo 5

Transformación bacteriana en *Bacillus subtilis*: medios y cepas bacterianas para la formación de las células competentes.

La transferencia de plásmidos diseñados para *Bacillus subtilis* usa la capacidad de entrada natural de los plásmidos durante una determinada etapa del crecimiento bacteriano, y es en consecuencia un efecto natural. Las transformaciones con pBS5 se realizaron con diferentes cepas de bacterias, particularmente WB800N (MOBITEC) o 1012 (MOBITEC). La primera cepa bacteriana se desarrolló para la expresión de proteínas recombinantes, ya que carece de ocho proteasas que podrían degradar las proteínas secretadas en particular (el producto del gen hasA, hialuronano sintasa, es una proteína transmembrana que por lo tanto podría experimentar proteólisis). La cepa 1012 se usó como célula huésped para la expresión de los plásmidos de la serie de pHT.

Se requieren los siguientes medios para la transformación:

Solución madre de metales 1000x

$MgCl_2$ 2M
$CaCl_2$ 0,7M
$MnCl_2$ 50 mM
$FeCl_3$ 5mM
$ZnCl_2$ 1mM

10x S-base 10xMM

2 g de $(NH_4)_2SO_4$
14 g de K_2HPO_4
6 g de K_2HPO_4

añadir agua destilada hasta 100 ml y esterilizar en autoclave

Medio HS

Por 100 ml:
10 ml 10 x S-base
12.5 ml de glucosa 4 % (m/v)
5 ml de L-triptófano 0.1 % (m/v)
2 ml de aminoácidos cas 1 % (m/v)
25 ml de extracto de levadura 2 % (m/v)
10 ml de arginina 8 % (m/v), histidina 0.4 % (m/v)
10 ml de citrato de sodio 1 % (m/v)
0.01 ml de MgSO4 1M
25.49 ml de agua destilada

Medio LS

Por 100 ml:
10 ml 10 x S-base
12.5 ml de glucosa 4 % (m/v)
0.5 ml de L-triptófano 0.1 % (m/v)
1 ml de aminoácidos cas 1 % (m/v)
5 ml de extracto de levadura al 2 % (m/v)
0.5 ml de MgCl2 0.5M
0.5 ml de CaCl2 0.1M
10 ml de citrato de sodio 1 % (m/v)
0.01 ml de MgSO4 1M
59.990 ml de agua destilada

Ejemplo 6

Preparación de células competentes de *Bacillus subtilis*

Una sola colonia de *Bacillus subtilis* se hace crecer durante la noche en 5 ml de medio HS a 37 °C. El día siguiente, se incubó 500 µl de este cultivo con 50 ml de medio HS y de nuevo se hace crecer bajo agitación vigorosa a 200 rpm. Cuando las células han alcanzado el estado estacionario, se recogen alícuotas de 10 ml cada 15 minutos. Se añade 1 ml de glicerol a cada alícuota, que se deja en hielo durante 15 minutos. Alícuotas de 1 ml se toman después y se almacenan a -80 °C hasta su uso. Las fracciones con la más alta tasa de transformación se usan para las siguientes transformaciones.

Ejemplo 7

Transformación de células competentes de *Bacillus subtilis* y su selección en gradiente de IPTG

Las células bacterianas convertidas en competentes se descongelan rápidamente en un baño termostático a 37 °C, se diluyen en 20 ml de medio LS en un Erlenmeyer de 250 ml, y se colocan en agitación durante 2 horas a 30 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, alícuotas de 1 ml se colocan en tubos de 15 ml a los que se añaden 10 µl de EDTA, y se mantienen a temperatura ambiente temperatura durante 5 minutos. El plásmido de ADN pBS5 se añade al tubo de ensayo y se incuba durante 2 horas a 37 °C, bajo agitación, con la aireación máxima. Después de suave centrifugación las células se colocan en placas en medio selectivo precalentado. Las colonias bacterianas se obtienen después de dos días. Las células no pueden crecer en solución debido a que crecen muy lentamente, y mueren después de la adición de IPTG; sobre todo, las pocas células vivas ya no contienen el plásmido recombinante. Para seleccionar bacterias viables capaces de expresar altos niveles de ácido hialurónico, las células se colocaron en placas en presencia de un

gradiente de IPTG. Como se muestra en la Figura 6, las células ubicadas cerca de una alta concentración de IPTG, mueren (porque la tuaD expresada en altos niveles es tóxica para *B. subtilis*); sin embargo, las células ubicadas en una posición donde se presenta una dosis más baja de IPTG, sobrevivieron.

Cuando se examinaron estas últimas, ellas se presentaron como colonias grandes, translúcidas (Figura 7), lo que indica la expresión de ácido hialurónico; estas células, seleccionadas y crecidas en presencia de IPTG, sobreviven, además, a dosis más altas de IPTG y conservan el plásmido durante la fermentación.

A través de este sistema de selección se obtuvieron líneas de bacterias viables, que son estables y, sobre todo secretan altos niveles de ácido hialurónico, incluso después de muchas divisiones celulares.

La estabilidad del plásmido se verificó por el cultivo de las células durante 24 horas en presencia de IPTG y sacarosa, y en presencia o ausencia de cloranfenicol. Como se muestra claramente en la Figura 8, el número de colonias permanece idéntico, lo que demuestra lo que se ha dicho, porque el plásmido contiene el gen de resistencia al cloranfenicol, mientras que la cepa que no ha sido transfectada, está desprovista de dicho gen.

Ejemplo 8

Fermentación de células de *B. subtilis* seleccionadas, transformadas

Las células de *Bacillus subtilis* transformadas con plásmido pBS5 y seleccionadas en gradiente de IPTG se cultivaron en un fermentador de 20 L en 5L de medio MM++ y glucosa o sacarosa como fuente de carbono.

IPTG se añadió como inductor después del inicio de la fermentación.

En lo sucesivo, algunos procesos de fermentación para la producción de HA que tienen diferentes pesos moleculares promedio ponderados se ilustran, dichos procesos difieren principalmente debido a:

- la fuente de partida de carbono;
- la alimentación añadida (glucosa o sacarosa), que se activa aproximadamente 7 horas después de la inducción con IPTG 0.4-0.5 mM;
- el tiempo de fermentación ocurrido y por lo tanto la masa final de células obtenida;
- la temperatura de la fermentación (la temperatura de fermentación puede establecerse en un intervalo entre 20 °C y 38 °C).

Ejemplo 8a

Producción de HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de 100-500 KD

Se usó la cepa bacteriana 1012 de *B. subtilis*, transfectada con el plásmido pBS5 seleccionado en gradiente de IPTG como se describió en el Ejemplo 7.

Procedimiento: una sola colonia resistente a IPTG se inoculó en 5 ml de medio LB estéril que contiene 10 µM de cloranfenicol, 10 µM de neomicina y 0.05 mM de IPTG. El cultivo se hizo crecer a 37 °C, con agitación a 200 rpm.

Después de 8 horas, 50 µl de este cultivo se inocularon en un matraz que contiene 50 ml del medio mencionado anteriormente (con 0.5 mM de IPTG), y se dejaron crecer bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Posteriormente, pasadas 14-16 horas adicionales, se inocularon 2 ml de este cultivo en un matraz que contenía 500 ml del medio anterior, y se dejaron crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar un O.D. a 600nm de 0.6-0.8.

Después se inocularon 500 ml del cultivo así obtenido en el fermentador y las condiciones de fermentación implicaron mantener el cultivo bajo agitación a 1300 rpm, aireación con 10-12 litros de aire/min, una temperatura de 37 °C y un pH de 6.9 a 7.1. La fuente inicial de carbono fue de 1 % de glucosa.

Después de 6 horas de fermentación, se añadió un suministro de 2 % de glucosa. A las 24 horas de fermentación, se añadió IPTG en una concentración final de 0.4 mM; esta inducción procedió durante 6 horas; al final, se añadió 10 % de glucosa en etapas.

Al final de la fermentación (130 horas), el cultivo bacteriano se descargó y se centrifugó a 7500 rpm a 8 °C durante 20 minutos.

El caldo de fermentación así obtenido, clarificado como libre de componente celular, se analizó para determinar la concentración de HA con el método de carbazol (Bitter y Muir, 1962, Anal. Biochem. 4:330-334).

Resultados: El análisis resultó en una concentración de HA de 7.5 g/l.

Determinación del peso molecular promedio ponderado MW:

Para su análisis se usó el método de la viscosidad intrínseca (como se describe en Terbojevich y otros, Carbohydr. Res. 1986, 363-377, incorporada en la presente como referencia).

Resultados: la muestra de HA analizada mostró un peso molecular promedio ponderado MW en el intervalo de 200-400 KD.

Medios de cultivo usados:

caldo LB (Miller), pH 7

MM++ (Medio Mínimo Bs), que contiene por litro:

5 g de NH_4Cl; 1 g de NH_4NO_3; 3 g de K_2HPO_4; 1 g de KH_2PO_4; 1 g de Na_2SO_4

a los medios estériles se añadieron 100 ml de una solución estéril que contiene:

0.1 g de $MgSO_4$. $7H_2O$; 0.005 g de $CaCl_2$ $2H_2O$; 2 ml de solución de biotina (solución biotina de 1 mg/l); 1 ml de solución de Fe (solución de $FeCl_3$ 0,2 M); extracto de levadura de 5 g/l, 0.01% de caseína hidrolizada; 5 mg/l de uracilo, 5 mg/l de DL-triptófano; 400 mg/l de Histidina; 400 mg/l de Arginina; solución de glucosa (1 % por litro).

Ejemplo 8b

Producción de HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de 500-1000 KD

Se usó la cepa bacteriana WB800N de *B. subtilis*, transfectada con el plásmido pBS5 seleccionado en gradiente de IPTG como se describió en el Ejemplo 7.

Procedimiento: una sola colonia resistente a IPTG se trató como anteriormente se describió de acuerdo con el Ejemplo 8a. La fuente inicial de carbono fue sacarosa al 2 %. Las condiciones de fermentación implicaron mantener el cultivo bajo agitación a 600 rpm, aireación con 22-24 litros de aire/min, una temperatura de 37 °C y un pH de 6.9 a 7.1.

Después de 6 horas de fermentación, se añadió IPTG en una concentración final de 0.4 mM; esta inducción prosiguió durante aproximadamente 4 horas; al final, se añadió 3 % de sacarosa en etapas, mientras se supervisó su concentración en el cultivo hasta el final de la fermentación (terminó después de 62 horas).

Los medios de cultivo usados para la fermentación fueron los descritos de acuerdo con Ejemplo 8a.

Al final del proceso, se analizó el caldo de fermentación para determinar la concentración de HA con el método de carbazol.

Resultados: El análisis resultó en una concentración de HA de 4.0 g/l.

Determinación del peso molecular promedio ponderado MW:

Para su análisis se usó el método de la viscosidad intrínseca como se indicó en el Ejemplo anterior 8a.

Resultados: la muestra de HA analizada mostró un peso molecular promedio ponderado MW en el intervalo de 550-800 KD.

Ejemplo 8c

Producción de HA que tiene un MW promedio ponderado comprendido en el intervalo de $1x10^6$-$2x10^6$ D

Se usó la cepa bacteriana 1012 de B. subtilis, transfectada con el plásmido pBS5 seleccionado en gradiente de IPTG como se describió en el Ejemplo 7.

Procedimiento: una sola colonia resistente a IPTG se trató como se describió anteriormente de acuerdo con el Ejemplo 8a. La fuente inicial de carbono fue sacarosa al 2 %: en este ejemplo, el suministro adicional fue glucosa (pruebas experimentales adicionales mostraron que puede sustituirse con iguales o menores cantidades de sacarosa). Las condiciones de fermentación fueron las mismas que las usadas en el Ejemplo 8a, pero la temperatura de fermentación fue de 30 °C.

Los medios de cultivo usados para la fermentación fueron los descritos de acuerdo con Ejemplo 8a.

El desarrollo de la masa celular fue de 30 g/l después de 20 horas.

Al final del proceso (finalizó después de 35 horas), se analizó el caldo de fermentación para determinar la concentración de HA con el método de carbazol.

Resultados: El análisis resultó en una concentración de HA de 3.3 g/l.

Determinación del peso molecular promedio ponderado MW:

Para su análisis se usó el método de la viscosidad intrínseca como se indicó en el Ejemplo anterior 8a.

Resultados: la muestra de HA analizada mostró un peso molecular promedio ponderado MW en el intervalo de $1.5x10^6$-$2x10^6$D.

El sistema diseñado en *B. subtilis* es inducible, por lo que el proceso de fermentación puede continuarse mediante la estimulación de la producción de HA para obtener el peso molecular promedio ponderado MW; tiempos de fermentación entre 80 y 160 horas resultan en un peso molecular promedio ponderado MW medio-bajo, comprendido en el intervalo entre 100-500 KD, tiempos de fermentación entre 40 y 80 horas resultan en un peso molecular promedio ponderado en el intervalo entre 500-1000 KD, tiempos de fermentación de 12 a 40 horas resultan en un peso molecular promedio ponderado MW en el intervalo $1x10^6$-$2x10^6$ D. Con los experimentos y los resultados obtenidos anteriormente, el solicitante ha demostrado que ha perfeccionado un sistema de producción de HA en *B. subtilis* mediante vectores de plásmidos derivado de:

- diseñar vectores de plásmidos de 2 genes (o 4 genes) para la síntesis de las enzimas necesarias para la producción de dicho polisacárido, cuyo control génico se coloca bajo el control del promotor inducible Pgrac;
- perfeccionar un sistema de selección de estas cepas transfectadas de *B. subtilis*, para la producción de cepas estables, viables, que se replican y secretan HA;
- crear un sistema inducible de producción de HA, controlable así tanto para obtener altas concentraciones de HA como para la producción de dicho polisacárido en diferentes pesos moleculares promedio ponderados MW.

Reivindicaciones

1. Proceso para la producción de ácido hialurónico en *Bacillus subtilis*, que comprende los siguientes etapas:

(a) cultivar células bacterianas huésped de *Bacillus subtilis* transformadas con el sistema grac-lac, en condiciones adecuadas para la producción de ácido hialurónico, y en presencia de isopropil-β-tio-galactopiranósido (IPTG) como inductor, en donde dichas células bacterianas huésped se caracterizan por estar transformadas con:

(i) al menos un vector de plásmido episómico que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa en tándem, bajo el control del promotor fuerte inducible Pgrac que usa el represor lac, o

(ii) al menos un vector de plásmido episómico que comprende una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa, y una secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa, bajo el control del promotor fuerte inducible Pgrac que usa el represor lac;

(b) recuperar el ácido hialurónico del medio de cultivo;

en donde dichas células huésped bacterianas de *Bacillus subtilis* transformadas con el vector de plásmido (i) o (ii) capaces de producir ácido hialurónico de la etapa a) se preseleccionan en la placa en gradiente de IPTG.

2. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el vector de plásmido episómico (i) o (ii) comprende además una secuencia que codifica para el represor lac.

3. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-2, en donde se añade el inductor IPTG en etapa a) en cantidades de entre 0.01 y 10 mM, preferentemente entre 0.01 y 5 mM, con mayor preferencia entre 0.4 mM y 1 mM.

4. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-3, en donde dichas células bacterianas huésped de *Bacillus subtilis* pertenecen a la cepa WB800N o 1012.

5. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-4 en donde la secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa (hasA) se obtiene de una cepa de *Streptococcus*, preferentemente de *Streptococcus zooepidemicus*, y las secuencias que codifican para las enzimas UDP-glucosa deshidrogenasa (hasB o tuaD), UDP- glucosa pirofosforilasa (hasC o gtaB) y glucosa 6 fosfato isomerasa (hasE o pgi), se derivan de *B. subtilis*.

6. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-5 en las que las secuencias que codifican para las enzimas hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa, incluyen la secuencia Shine-Dalgarno aguas arriba.

7. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-6, en donde dicho vector de plásmido (i) comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 15.

8. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-7 en donde el tiempo de fermentación está comprendido en el intervalo entre 80 y 160 horas para producir HA que tiene un peso molecular promedio ponderado comprendido en el intervalo 100-500 KD.

9. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-7 en donde el tiempo de fermentación está comprendido en el intervalo entre 40 y 80 horas para producir HA que tiene un peso molecular promedio ponderado comprendido en el intervalo 500-1000 KD.

10. Proceso de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 1-7 en donde cuando se usan células huésped bacterianas de *B. subtilis*, el tiempo de fermentación está comprendido en el intervalo entre 12 y 40 horas para producir HA que tiene un peso molecular promedio ponderado comprendido en el intervalo $1x10^6$-$2x10^6$ D.

11. Vector de plásmido que comprende un promotor fuerte inducible Pgrac operativamente unido a una secuencia que codifica para enzima hialuronano sintasa y una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa en tándem.

12. Vector de plásmido que comprende un promotor fuerte inducible Pgrac operativamente unido a una secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa, una secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa, y una secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa.

13. Vector de plásmido conformidad con la reivindicación 11 o 12, que comprende además una secuencia que codifica para el represor lac.

14. Vector de plásmido de conformidad con la reivindicación 11 o 13, en donde dicha secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa es el gen hasA de *Streptococcus zooepidemicus*, y dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa es el gen tuaD de *Bacillus subtilis*.

15. Vector de plásmido de conformidad con la reivindicación 14, que comprende o que consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos:

TTAAGTTATTGGTATGACTGGTTTTAAGCGCAAAAAAAGTTGCTTTTTCGTACCTATTAA

TGTATCGTTTTAGAAAACCGACTGTAAAAAGTACAGTCGGCATTATCTCATATTATAAAA

GCCAGTCATTAGGCCTATCTGACAATTCCTGAATAGAGTTCATAAACAATCCTGCATGAT

AACCATCACAAACAGAATGATGTACCTGTAAAGATAGCGGTAAATATATTGAATTACCTT

TATTAATGAATTTTCCTGCTGTAATAATGGGTAGAAGGTAATTACTATTATTATTGATAT

TTAAGTTAAACCCAGTAAATGAAGTCCATGGAATAATAGAAAGAGAAAAAGCATTTTCAG

GTATAGGTGTTTTGGGAAACAATTTCCCCGAACCATTATATTTCTCTACATCAGAAAGGT

ATAAATCATAAAACTCTTTGAAGTCATTCTTTACAGGAGTCCAAATACCAGAGAATGTTT

TAGATACACCATCAAAAATTGTATAAAGTGGCTCTAACTTATCCCAATAACCTAACTCTC

CGTCGCTATTGTAACCAGTTCTAAAAGCTGTATTTGAGTTTATCACCCTTGTCACTAAGA

AAATAAATGCAGGGTAAAATTTATATCCTTCTTGTTTTATGTTTCGGTATAAAACACTAA

TATCAATTTCTGTGGTTATACTAAAAGTCGTTTGTTGGTTCAAATAATGATTAAATATCT

CTTTTCTCTTCCAATTGTCTAAATCAATTTTATTAAAGTTCATTTGATATGCCTCCTAAA

TTTTTATCTAAAGTGAATTTAGGAGGCTTACTTGTCTGCTTTCTTCATTAGAATCAATCC

TTTTTTAAAAGTCAATATTACTGTAACATAAATATATATTTTAAAAATATCCCACTTTAT

CCAATTTTCGTTTGTTGAACTAATGGGTGCTTTAGTTGAAGAATAAAGACCACATTAAAA

AATGTGGTCTTTTGTGTTTTTTTAAAGGATTTGAGCGTAGCGAAAAATCCTTTTCTTTCT

TATCTTGATAATAAGGGTAACTATTGCCGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACT

ATGGCGTGCTGCTAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG

GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA

AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTC

GAGCTCAGGCCTTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGA

AACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGT

ATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTT

CACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCG

AAAATCCTGTTTGATGGTGGTTGACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTC

GTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCAT

TGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATT

CAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGC

TATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGC

CGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAG

ATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGT

CTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAAT

GGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAG

ATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCAC

GCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTG

CAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTG

TGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGT

TTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACC

GGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCATCAAAATCGTCTCCCTCCGTTT

GAATATTTGATTGATCGTAACCAGATGAAGCACTCTTTCCACTATCCCTACAGTGTTATG

GCTTGAACAATCACGAAACAATAATTGGTACGTACGATCTTTCAGCCGACTCAAACATCA

AATCTTACAAATGTAGTCTTTGAAAGTATTACATATGTAAGATTTAAATGCAACCGTTTT

TTCGGAAGGAAATGATGACCTCGTTTCCACCGGAATTAGCTTGGTACCAGCTATTGTAAC

ATAATCGGTACGGGGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGC

GTGAAAAATTTTTTTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATT

GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAATTAAAGGAGGAAGGATCCATGAGAACATTA

AAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTTGGGTACTGTTGATTTACGTCAAT

GTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCAATTTATGGCTTTTTGCTGATAGCTTAC

CTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTACAAGCCATTTAAGGGAAGGGCTGGGCAA

TATAAGGTTGCAGCCATTATTCCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACC

TTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCAGAAATTTATGTTGTTGACGATGGA

AGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGACACTGGTGACCTA

TCAAGCAATGTCATTGTTCACCGGTCAGAAAAAAATCAAGGAAAGCGTCATGCACAGGCC

TGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTGACCGTTGACTCAGATACTTATATC

TACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACTGTTTTTGCTGCG

ACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGCTTGACAGATATT

CGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCCAATCCGTTACAGGTAATATTCTC

GTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCCTAACATAGATAGA

TACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCCTGTAAGTATCGGTGATGACAGGTGCTTGACC

AACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAATGTATTACAGAT

GTTCCTGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTT

AGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTGTAGCCCTATGGACC

ATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTTTATTCTGTGGTGGATTTCTTTGTAGGC

AATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTGGCCTTTCTGGTGATTATCTTCATTGTT

GCTCTTTGTCGTAATATTCACTATATGCTTAAGCACCCGCTGTCCTTCTTGTTATCTCCG

TTTTATGGGGTACTGCATTTGTTTGTCCTACAGCCCTTGAAATTGTATTCTCTTTTTACT

ATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAATTATTATAATCTAGAAATAATTTTGTT

TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAAATAGCTGTCATTGGAACAGGTTATGTA

GGACTCGTATCAGGCACTTGCTTTGCGGAGATCGGCAATAAAGTTGTTTGCTGTGATATC

GATGAATCAAAAATCAGAAGCCTGAAAAATGGGGTAATCCCAATCTATGAACCAGGGCTT

GCAGACTTAGTTGAAAAAAATGTGCTGGATCAGCGCCTGACCTTTACGAACGATATCCCG

TCTGCCATTCGGGCCTCAGATATTATTTATATTGCAGTCGGAACGCCTATGTCCAAAACA

GGTGAAGCTGATTTAACGTACGTCAAAGCGGCGGCGAAAACAATCGGTGAGCATCTTAAC

GGCTACAAAGTGATCGTAAATAAAAGCACAGTCCCGGTTGGAACAGGGAAACTGGTGCAA

TCTATCGTTCAAAAAGCCTCAAAGGGGAGATACTCATTTGATGTTGTATCTAACCCTGAA

TTCCTTCGGGAAGGGTCAGCGATTCATGACACGATGAATATGGAGCGTGCCGTGATTGGT

TCAACAAGTCATAAAGCCGCTGCCATCATTGAGGAACTTCATCAGCCATTCCATGCTCCT

GTCATTAAAACAAACCTAGAAAGTGCAGAAATGATTAAATACGCCGCGAATGCATTTCTG

GCGACAAAGATTTCCTTTATCAACGATATCGCAAACATTTGTGAGCGAGTCGGCGCAGAC

GTTTCAAAAGTTGCTGATGGTGTTGGTCTTGACAGCCGTATCGGCAGAAAGTTCCTTAAA

GCTGGTATTGGATTCGGCGGTTCATGTTTTCCAAAGGATACAACCGCGCTGCTTCAAATC

GCAAAATCGGCAGGCTATCCATTCAAGCTCATCGAAGCTGTCATTGAAACGAACGAAAAG

CAGCGTGTTCATATTGTAGATAAACTTTTGACTGTTATGGGAAGCGTCAAAGGGAGAACC

ATTTCAGTCCTGGGATTAGCCTTCAAACCGAATACGAACGATGTGAGATCCGCTCCAGCG

CTTGATATTATCCCAATGCTGCAGCAGCTGGGCGCCCATGTAAAAGCATACGATCCGATT

GCTATTCCTGAAGCTTCAGCGATCCTTGGCGAACAGGTCGAGTATTACACAGATGTGTAT

GCTGCGATGGAAGACACTGATGCATGCCTGATTTTAACGGATTGGCCGGAAGTGAAAGAA

ATGGAGCTTGTAAAAGTGAAAACCCTCTTAAAACAGCCAGTCATCATTGACGGCAGAAAT

TTATTTTCACTTGAAGAGATGCAGGCAGCCGGATACATTTATCACTCTATCGGCCGTCCC

GCTGTTCGGGGAACGGAACCCTCTGACAAGTATTTTCCGGGCTTGCCGCTTGAAGAATTG

GCTAAAGACTTGGGAAGCGTCAATTTATAAGCTAGAGTCGACGTCCCCGGGGCAGCCCGC

CTAATGAGCGGGCTTTTTTTCACGTCACGCGTCCATGGAGATCTTTGTCTGCAACTGAAAA

GTTTATACCTTACCTGGAACAAATGGTTGAAACATACGAGGCTAATATCGGCTTATTAGG

AATAGTCCCTGTACTAATAAAATCAGGTGGATCAGTTGATCAGTATATTTTGGACGAAGC

TCGGAAAGAATTTGGAGATGACTTGCTTAATTCCACAATTAAATTAAGGGAAAGAATAAA

GCGATTTGATGTTCAAGGAATCACGGAAGAAGATACTCATGATAAAGAAGCTCTAAAACT

ATTCAATAACCTTACAATGGAATTGATCGAAAGGGTGGAAGGTTAATGGTACGAAAATTA

GGGGATCTACCTAGAAAGCCACAAGGCGATAGGTCAAGCTTAAAGAACCCTTACATGGAT

CTTACAGATTCTGAAAGTAAAGAAACAACAGAGGTTAAACAAACAGAACCAAAAAGAAAA

AAAGCATTGTTGAAAACAATGAAAGTTGATGTTTCAATCCATAATAAGATTAAATCGCTG

CACGAAATTCTGGCAGCATCCGAAGGGAATTCATATTACTTAGAGGATACTATTGAGAGA

GCTATTGATAAGATGGTTGAGACATTACCTGAGAGCCAAAAAACTTTTTATGAATATGAA

TTAAAAAAAAAGAACCAACAAAGGCTGAGACAGACTCCAAACGAGTCTGTTTTTTTAAAAA

AAATATTAGGAGCATTGAATATATATTAGAGAATTAAGAAAGACATGGGAATAAAAATAT

TTTAAATCCAGTAAAAATATGATAAGATTATTTCAGAATATGAAGAACTCTGTTTGTTTT

TGATGAAAAAACAAACAAAAAAAATCCACCTAACGGAATCTCAATTTAACTAACAGCGGC

CAAACTGAGAAGTTAAATTTGAGAAGGGGAAAAGGCGGATTTATACTTGTATTTAACTAT

CTCCATTTTAACATTTTATTAAACCCCATACAAGTGAAAATCCTCTTTTACACTGTTCCT

TTAGGTGATCGCGGAGGGACATTATGAGTGAAGTAAACCTAAAAGGAAATACAGATGAAT

TAGTGTATTATCGACAGCAAACCACTGGAAATAAAATCGCCAGGAAGAGAATCAAAAAAG

GGAAAGAAGAAGTTTATTATGTTGCTGAAACGGAAGAGAAGATATGGACAGAAGAGCAAA

TAAAAAACTTTTCTTTAGACAAATTTGGTACGCATATACCTTACATAGAAGGTCATTATA

CAATCTTAAATAATTACTTCTTTGATTTTTGGGGCTATTTTTTAGGTGCTGAAGGAATTG

CGCTCTATGCTCACCTAACTCGTTATGCATACGGCAGCAAAGACTTTTGCTTTCCTAGTC

TACAAACAATCGCTAAAAAAATGGACAAGACTCCTGTTACAGTTAGAGGCTACTTGAAAC

TGCTTGAAAGGTACGGTTTTATTTGGAAGGTAAACGTCCGTAATAAAACCAAGGATAACA

CAGAGGAATCCCCGATTTTTAAGATTAGACGTAAGGTTCCTTTGCTTTCAGAAGAACTTT

TAAATGGAAACCCTAATATTGAAATTCCAGATGACGAGGAAGCACATGTAAAGAAGGCTT

TAAAAAAGGAAAAAGAGGGTCTTCCAAAGGTTTTGAAAAAAGAGCACGATGAATTTGTTA

AAAAAATGATGGATGAGTCAGAAACAATTAATATTCCAGAGGCCTTACAATATGACACAA

TGTATGAAGATATACTCAGTAAAGGAGAAATTCGAAAAGAAATCAAAAAACAAATACCTA

ATCCTACAACATCTTTTGAGAGTATATCAATGACAACTGAAGAGGAAAAAGTCGACAGTA

CTTTAAAAAGCGAAATGCAAAATCGTGTCTCTAAGCCTTCTTTTGATACCTGGTTTAAAA

ACACTAAGATCAAAATTGAAAATAAAAATTGTTTATTACTTGTACCGAGTGAATTTGCAT

TTGAATGGATTAAGAAAAGATATTTAGAAACAATTAAAACAGTCCTTGAAGAAGCTGGAT

ATGTTTTCGAAAAAATCGAACTAAGAAAAGTGCAATAAACTGCTGAAGTATTTCAGCAGT

TTTTTTTATTTAGAAATAGTGAAAAAAATATAATCAGGGAGGTATCAATATTTAATGAGT

ACTGATTTAAATTTATTTAGACTGGAATTAATAATTAACACGTAGACTAATTAAAATTTA

ATGAGGGATAAAGAGGATACAAAAATATTAATTTCAATCCCTATTAAATTTTAACAAGGG

GGGGATTAAAATTTAATTAGAGGTTTATCCACAAGAAAAGACCCTAATAAAATTTTTACT

AGGGTTATAACACTGATTAATTTCTTAATGGGGGAGGGATTAAAATTTAATGACAAAGAA

AACAATCTTTTAAGAAAAGCTTTTAAAAGATAATAATAAAAAGAGCTTTGCGATTAAGCA

AAACTCTTTACTTTTTCATTGACATTATCAAATTCATCGATTTCAAATTGTTGTTGTATC

ATAAAGTTAATTCTGTTTTGCACAACCTTTTCAGGAATATAAAACACATCTGAGGCTTGT

TTTATAAACTCAGGGTCGCTAAAGTCAATGTAACGTAGCATATGATATGGTATAGCTTCC

ACCCAAGTTAGCCTTTCTGCTTCTTCTGAATGTTTTTCATATACTTCCATGGGTATCTCT

AAATGATTTTCCTCATGTAGCAAGGTATGAGCAAAAAGTTTATGGAATTGATAGTTCCTC

TCTTTTTCTTCAACTTTTTTATCTAAAACAAACACTTTAACATCTGAGTCAATGTAAGCA

TAAGATGTTTTTCCAGTCATAATTTCAATCCCAAATCTTTTAGACAGAAATTCTGGACGT

AAATCTTTTGGTGAAAGAATTTTTTTATGTAGCAATATATCCGATACAGCACCTTCTAAA

AGCGTTGGTGAATAGGGCATTTTACCTATCTCCTCTCATTTTGTGGAATAAAAATAGTCA

TATTCGTCCATCTACCTATCCTATTATCGAACAGTTGAACTTTTTTAATCAAGGATCAGTC

CTTTTTTTCATTATTCTTAAACTGTGCTCTTAACTTTAACAACTCGATTTGTTTTTCCAG

ATCTCGAGGGTAACTAGCCTCGCCGATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTCAGGTGGCACTTT

TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA

TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT

GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT

TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG

AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGA

AGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCG

TATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT

TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG

CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG

AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGA

TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC

TGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC

CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC

GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG

CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAC

GACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC

ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT

AAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC

CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA

AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC

ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT

AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG

CCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC

AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTT

ACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA

GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT

TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG

CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA

CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA

CGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA

TACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

GCGCCCAATACG

sec. con núm. de ident.:1

16. Vector de plásmido de conformidad con la reivindicación 12 o 13, en donde dicha secuencia que codifica para la enzima hialuronano sintasa es el gen hasA de *Streptococcus zooepidemicus*, dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa es el gen tuaD de *Bacillus subtilis*, dicha secuencia que codifica para la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa es el gen gtaB de *Bacillus subtilis*, y dicha secuencia que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa es el gen pgi de *Bacillus subtilis*.

17. Vector de plásmido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-16 en donde las secuencias que codifican para las enzimas hialuronano sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y glucosa 6 fosfato isomerasa, comprenden la secuencia Shine-Dalgarno aguas arriba.

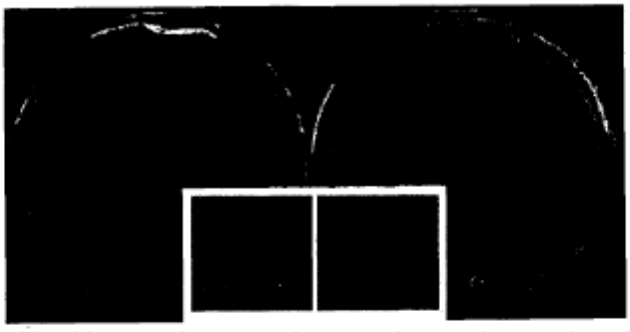
18. Uso de al menos un vector de plásmido como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-17 para la transformación de una célula huésped bacteriana de *Bacillus subtilis* para la producción de ácido hialurónico por estas células mediante inducción con IPTG después de la selección en la placa en gradiente de IPTG.

19. Célula huésped bacteriana recombinante de *Bacillus subtilis*, que comprende al menos un vector de plásmido como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-17.

20. Uso de la célula huésped bacteriana como se define de conformidad con la reivindicación 19 para la producción de ácido hialurónico mediante inducción con IPTG después de la selección en la placa en gradiente de IPTG.

21. Método para la obtención de células huésped bacterianas recombinantes tal como se define de conformidad con la reivindicación 19 capaz de producir altos niveles de ácido hialurónico, que tiene peso molecular específico, que comprende la selección en la placa en gradiente de IPTG.

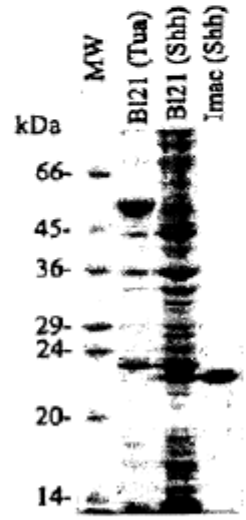
Expresión de hasA y tuaD en E. coli TOP10



Las células con el plásmido HT01 incorporado son más grandes que las células con BS5 (dificultades de crecimiento)

Las células con BS5 incorporado son más amarillas que las células parentales

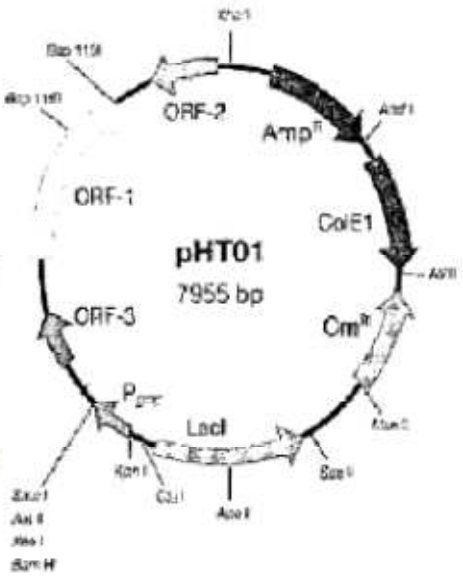
Fig. 1



Expresión de tuaD en E. coli BL21 DE3

Fig. 2

2.1 Mapa del vector pHT01



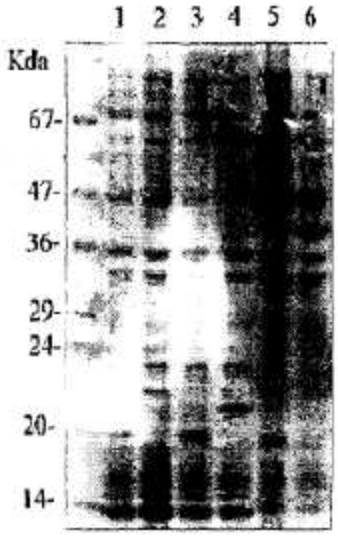
Pgrac: promotor *Pgrac* (que consiste en el promotor *gro*E, el operador *lac*O y la secuencia *gsB* SD)
ori *Col*E1: origen *Col*E1
Amp^R: gen de resistencia a ampicilina
lacI; gen *lacI*(represor *lacI*)
Cm^R gen de resistencia a cloranfenicol

La secuencia completa del ADN está disponible bajo solicitud

gaaaagaatgatgtaagcgrgaaaaattttttatcttatcac
TTGAAAttggaaggga gattcttTATTATaagaattgt
-35 -10
ggAATTGTGAGCG GATAACAATTeeeaatt
lacO
aaaggaggaaggatcctctagagtcgacgtcccgggcagcc
RBS *Bam*HI *Xba*I *Acc*II *Sma*I

Fig. 3

Expresión constitutiva de hialuronano sintasa (Estrept) en E. coli



La proteína codificada, designada seHAS es de 417 aminoácidos de longitud (peso molecular calculado 47778; pI calculado, 9.1) y es el miembro de la familia más pequeño identificado hasta el momento. La enzima migra anómalamente rápido en electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (~42000 Da)

Fig. 4

Expresión de HA en E. coli mediante análisis de carbazol del ácido glucurónico a 530 nm

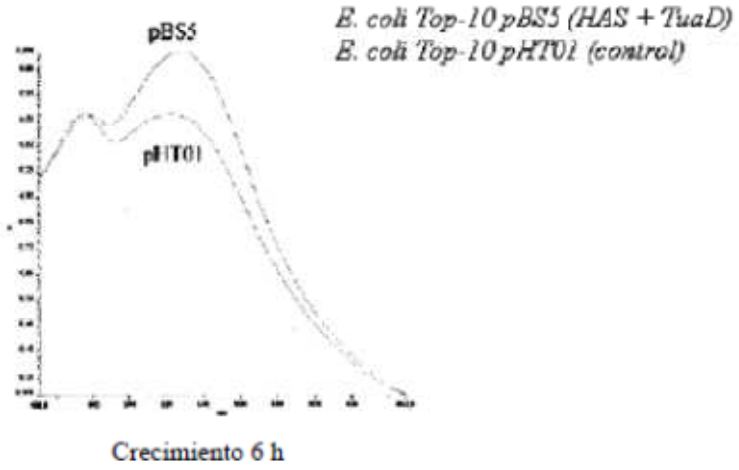


Fig. 5

Bacillus subtilis

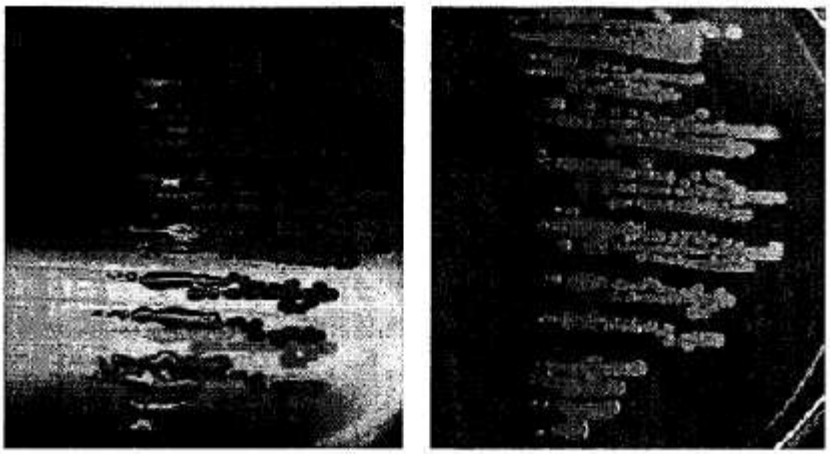
Expresión de ácido hialurónico en placas

800N BS5 1012 BS5 (1) 1012 BS5 (2)

Cuando las bacterias se siembran en presencia de IPTG 1 mM, ellas mueren.
tuaD expresada en altos niveles es tóxica para Bacillus subtilis

Fig. 6

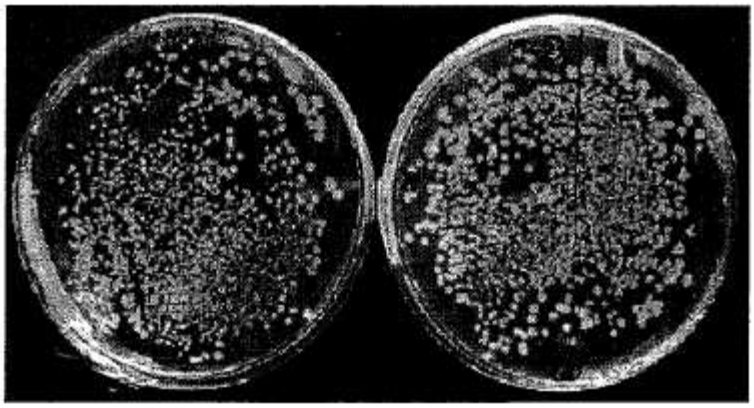
Expresión de ácido hialurónico en placas



Las colonias grandes y translúcidas producen HA

Fig. 7

Estabilidad del plásmido después del crecimiento



Cloranfenicol + Cloranfenicol -

Fig. 8