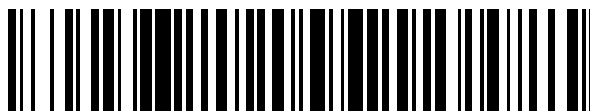


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 846**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2009** **PCT/EP2009/063200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010** **WO2010046250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2009** **E 09740088 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016** **EP 2340306**

54 Título: **Ácidos nucleicos con expresión aumentada**

30 Prioridad:

21.10.2008 DE 102008052529

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

22.06.2017

73 Titular/es:

BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE

72 Inventor/es:

RADNAI, VICTORIA;
EVERS, STEFAN;
BONGAERTS, JOHANNES y
MAURER, KARL-HEINZ

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 618 846 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

Ácidos nucleicos con expresión aumentada

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos con un promotor tándem especial, que provocan una expresión aumentada de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido en una célula huésped, así como vectores y células huésped, que contienen un ácido nucleico de este tipo. Así mismo, la solicitud se refiere a procedimientos y usos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped de este tipo, en particular a usos y procedimientos de fermentación.

La presente invención se basa en el campo de la Biotecnología, en particular la preparación de polipéptidos mediante fermentación de microorganismos que tienen la capacidad de formar los materiales de interés, en particular polipéptidos. Para ello se emplean microorganismos que expresan los genes de los polipéptidos de interés, de modo que se trata por lo tanto de organismos transgénicos, modificados genéticamente (OMG). Estos microorganismos se denominan también células huésped. Los genes de los polipéptidos de interés se incorporaron por regla general en las células huésped de tal manera que se expresan también por las mismas. Con frecuencia, se encuentran sobre los denominados vectores de expresión junto con secuencias promotoras (promotores), que permiten la expresión génica.

Para la fermentación de microorganismos existe un amplio estado de la técnica, en particular también a escala industrial; este va desde la optimización de las cepas en cuestión con respecto a la tasa de formación y el aprovechamiento de nutrientes pasando por la configuración técnica de los fermentadores hasta la obtención de los materiales de las células en cuestión en sí y/o el medio de fermentación. Para ello se tienen en cuenta planteamientos genéticos y microbiológicos como de procedimientos técnicos y bioquímicos.

Con frecuencia se emplean por ejemplo microorganismos del género *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, *Escherichia* o *Pseudomonas* u hongos filamentosos.

En este caso es deseable obtener un rendimiento lo más alto posible en la fermentación. El rendimiento de producto depende a este respecto de varios factores. Por ejemplo, los microorganismos forman, además del producto verdaderamente deseado, habitualmente una pluralidad de sustancias adicionales que, por regla general, carecen de interés. Por lo tanto, estos rendimientos de síntesis van a parar a los costes de la formación del producto deseado. En la expresión de un transgén, es decir de un gen, que se incorporó en la célula huésped, esta depende, y por lo tanto el rendimiento de producto, esencialmente del sistema de expresión usado. A este respecto, desempeñan un papel especial los promotores que se usan para la expresión del transgén en la célula huésped. Los promotores son conocidos en forma diversa en el estado de la técnica, sin embargo solo promotores seleccionados en combinación con un transgén concreto en una célula huésped llevan a una expresión satisfactoria del transgén y con ello a un rendimiento de producto satisfactorio.

Para aumentar el rendimiento de producto se propuso además en la publicación para información de solicitud de patente europea EP 1056873, usar promotores tándem para la expresión del gen, que se componen de dos promotores seleccionados. Si bien en el estado de la técnica se conoce una pluralidad de promotores, que podrían usarse en principio combinados para la expresión de un transgén. Sin embargo, en absoluto no cualquier combinación de promotores posibles en principio lleva a una expresión de un transgén aumentada mejorada, de modo que con ello se consigue un aumento del rendimiento de producto.

Por lo tanto, es objetivo de la invención aumentar el rendimiento de producto en una fermentación. En particular, se proporcionará un ácido nucleico con el uso del cual se aumente la expresión de un transgén en una célula huésped y con ello el rendimiento de producto en una fermentación.

Otros objetivos consistían en la provisión de vectores, células huésped, procedimientos de preparación y usos, con el uso o la aplicación de los cuales se aumentara la expresión de un transgén y con ello el rendimiento de producto en una fermentación.

Un objeto de la invención es por lo tanto un ácido nucleico no natural que comprende

- a) una primera secuencia promotora que comprende una secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la SEQ ID NO. 7 en al menos el 75 %,
- b) una segunda secuencia promotora que comprende una secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la SEQ ID NO. 6 en las posiciones 7 a 234 en al menos el 78,5 %,
- c) una secuencia de ácido nucleico, que codifica para un polipéptido, caracterizado porque en la molécula de ácido nucleico, en orientación 5'→3', la segunda secuencia promotora se encuentra delante de la primera secuencia promotora.

Un ácido nucleico de acuerdo con la invención provoca por lo tanto la expresión de la secuencia de ácido nucleico (c) en un organismo huésped debido a la presencia de las secuencias promotoras primera y segunda (a) y (b). La expresión de un gen es su traducción en el o los producto(s) génico(s) codificado(s) por este gen, es decir, en un polipéptido (proteína) o en varios polipéptidos (proteínas). Por regla general, la expresión génica comprende la

transcripción, es decir, la síntesis de un ácido ribonucleico (ARNm) por medio de la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) del gen y su traducción en la cadena de polipéptido correspondiente. La expresión de un gen lleva a la formación del producto génico correspondiente, que con frecuencia presenta y/o provoca una actividad fisiológica y/o contribuye a una actividad fisiológica más relevante, en la que participan varios productos génicos distintos. Ejemplos de ello son enzimas. El producto génico puede tener sin embargo también un efecto estructurador. Ejemplos de ello son proteínas de la membrana celular o de la pared celular o del citoesqueleto. Los términos polipéptido y proteína se usan como sinónimos en la presente solicitud, dado que una proteína es un polipéptido.

Para la expresión de un gen son esenciales secuencias con una función de control para la expresión de este gen (las denominadas secuencias reguladoras génicas) tales como en particular secuencias promotoras, pero también por ejemplo secuencias potenciadoras o, en general, secuencias reguladoras génicas adicionales. Con frecuencia, tales secuencias se encuentran en fragmentos de secuencias adyacentes al fragmento de ácido nucleico que codifica para el polipéptido, las denominadas regiones flanqueantes. Las regiones flanqueantes pueden determinarse a este respecto partiendo de las secuencias conocidas a través de métodos en sí conocidos, por ejemplo con ayuda de cebadores de PCR dirigidos hacia fuera y una preparación de ADN genómico como matrices ("PCR anclada"). Por ejemplo, en este caso se parte de una preparación del ADN genómico del organismo, cuyo ácido nucleico debe usarse. A este respecto, una secuencia de ADN conocida, por ejemplo una parte de la secuencia que codifica para un polipéptido, sirve como sonda para la identificación de fragmentos que portan gen en una hibridación de transferencia tipo Southern. Los fragmentos positivos pueden aislarse de acuerdo con métodos conocidos y establecidos en el estado de la técnica y pueden clonarse en vectores incluyendo las regiones flanqueantes. Por medio de la misma secuencia, pueden idearse entonces cebadores secuenciadores orientados hacia fuera y deducirse las regiones flanqueantes desconocidas a través de secuenciación. En este caso, la región promotora se encuentra con frecuencia directamente antes, es decir en sentido 5' de la parte codificante de proteína y abarca raramente más de algunos cientos de nucleótidos. Como alternativa a este planteamiento experimental pueden extraerse las regiones no codificantes de este tipo al menos en parte para muchos genes de entradas en bancos de datos para los microorganismos respectivos o para especies relacionadas con los mismos, por ejemplo el banco de datos Subtilist del Instituto Pasteur, París, Francia (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/index.html>), en particular para *Bacillus subtilis*.

Por un promotor se entiende por consiguiente una secuencia de ADN que permite la expresión regulada de un gen. Naturalmente, una secuencia promotora es un constituyente de un gen y se encuentra con frecuencia en su extremo 5' y, por lo tanto, delante de la región codificante del ARN. La propiedad más importante de un promotor es la interacción específica con al menos una proteína de unión a DNA o polipéptido, que media en el inicio de la transcripción del gen mediante una ARN-polimerasa y se denomina factor de transcripción. Con frecuencia participan varios factores de transcripción y/o proteínas adicionales en el inicio de la transcripción mediante una ARN-polimerasa. Un promotor es por consiguiente una secuencia de ADN con actividad promotora, es decir una secuencia de ADN, a la que se une al menos de manera transitoria al menos un factor de transcripción para la iniciación de la transcripción de un gen. La fuerza de un promotor puede medirse a través de la frecuencia de transcripción del gen expresado, es decir, a través del número de las moléculas de ARN generadas por unidad de tiempo, en particular moléculas de ARNm.

Factores de transcripción bacterianos importantes son los factores Sigma. La estructura de un promotor bacteriano depende por lo tanto, sobre todo, por cuál de los factores Sigma es reconocido el mismo. En el caso del organismo de modelo de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) la mayoría de los promotores se reconocen a través del factor Sigma-70. El factor análogo al Sigma-70 de *E. coli* en *Bacillus*, por ejemplo *Bacillus subtilis*, es Sigma-A (SigA).

Por medio de secuencias consenso pueden clasificarse en los genes los siguientes elementos promotores generales:

- una región -35- con la secuencia consenso: 5'-TTGACA-3' (SEQ ID NO.1),
- una región -10- (caja Pribnow o caja Pribnow-Schaller) con la secuencia consenso: 5'-TATAAT-3' (SEQ ID NO. 2),
- un elemento "upstream" rico en pares de bases AT (en sentido 5') por encima de la región -35 y/o - 10.

Con respecto a la nomenclatura de las posiciones, el primer nucleótido o par de bases transcrito a nivel de ADN obtiene la posición +1, de modo que las posiciones más aguas arriba de nucleótidos o pares de bases situados más aguas arriba (5') obtienen signos negativos, mientras que los nucleótidos o pares de bases situados más aguas abajo (3') se designan con posiciones más positivas (+2, +3, +4, etc.).

Mientras que la región -35- y región -10 se obtienen principalmente mediante un factor Sigma, el elemento "upstream" es capaz con frecuencia de interactuar directamente con la subunidad α de una ARN-polimerasa bacteriana.

Las secuencias consenso son sin embargo solo un indicio aproximado para la construcción de un promotor. Los promotores específicos pueden desviarse en uno o varios sitios de estas secuencias.

Así mismo, los promotores intensos, directamente antes del punto de inicio de la transcripción, con frecuencia son ricos en pares de bases AT, lo que simplifica la separación necesaria de la doble hélice de ADN para la transcripción, dado que los pares de bases AT forman menos puentes de hidrógeno que los pares de bases GC.

El promotor del gen subC (promotor subC) que codifica para una subtilisina es una secuencia de ADN con actividad promotora que, en una bacteria del género *Bacillus* provoca naturalmente la transcripción de un gen que codifica para una subtilisina o que es necesario para esta. Una denominación igualmente común para el promotor de subC es promotor de aprE. Por ejemplo, el gen correspondiente que codifica para una subtilisina en *Bacillus subtilis* se denomina por regla general aprE, mientras que el gen correspondiente que codifica para una subtilisina en *Bacillus licheniformis* se denomina por regla general subC, que codifica para la subtilisina Carlsberg. Naturalmente, en este contexto, significa que la subtilisina es un polipéptido o proteína propio de una bacteria, cuyo gen se transcribe por la bacteria en su forma de tipo natural.

Preferentemente, un promotor de subC de acuerdo con la invención comprende una región -35- y una región -10, que están separadas por una secuencia espaciadora. Preferentemente, el promotor presenta una región -10 que presenta una alta similitud con la secuencia consenso, por ejemplo 5'-TAcAAT-3' (SEQ ID NO. 3). La región -35 puede presentar mayores desviaciones de la secuencia consenso y coincidir por ejemplo en solo dos de los seis nucleótidos con la secuencia consenso, es decir por ejemplo 5'-TactaA-3' (SEQ ID NO.4). En cuanto a la nomenclatura, las letras minúsculas de la secuencia consenso representan nucleótidos que se desvían. También las secuencias alrededor de las regiones -35 y -10, así por ejemplo la espaciadora entre la región -35 y la región -10, que puede tener por ejemplo 17 pares de bases de largo, o la región 3' (aguas arriba) de la región -10 (hasta +40) son importantes para la intensidad del promotor.

Más preferentemente, el promotor de subC provoca en una bacteria del género *Bacillus* naturalmente la transcripción de un gen que codifica para subtilisina Carlsberg o secuencia de aminoácido correspondiente a una subtilisina Carlsberg o es necesaria para esta. La subtilisina Carlsberg se describe en las publicaciones de E. L. Smith et al. (1968) en *J. Biol. Chem.*, Vol. 243, página 2184 y siguientes y de Jacobs et al. (1985) en *Nucl. Acids Res.*, volumen 13, página 8913 y siguientes así como Jacobs et al. (1995) en *Gene* 152(1), página 69 y siguientes y presenta una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 5. Se forma naturalmente por *Bacillus licheniformis*. De manera especialmente preferente, en el caso del promotor de subC se trata por lo tanto de aquel promotor que provoca en *Bacillus licheniformis* naturalmente la transcripción del gen que codifica para subtilisina Carlsberg o secuencia de aminoácidos correspondiente a una subtilisina Carlsberg o que es necesario para la misma. Una secuencia de aminoácidos correspondiente a subtilisina Carlsberg es idéntica a la de subtilisina Carlsberg de manera progresivamente preferente en el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 % y el 99,5 %.

Un promotor de subC preferido adicional de acuerdo con la invención se divulga como "ATCC 53926 *alkaline protease gene promoter*" en la solicitud de patente internacional WO 91/02792. De manera especialmente preferente, un promotor de subC de acuerdo con la invención abarca una secuencia que corresponde a la secuencia divulgada en la Figura 27 en el documento WO 91/02792 en las posiciones 84 hasta el sitio de inicio de la transcripción ("*transcription start site*") (indicada como SEQ ID NO.7), o una secuencia que es idéntica a la misma en al menos el 75 %.

El promotor del gen rpsB (promotor de rpsB) que codifica para una proteína ribosómica S2, es una secuencia de ADN con actividad promotora que provoca en una bacteria del género *Bacillus* naturalmente la transcripción de un gen que codifica para la proteína ribosómica S2 o que es necesaria para la misma.

Una proteína ribosómica es una de las proteínas que, en relación con ARN ribosómico (ARNr) y proteínas adicionales, forman una subunidad ribosómica de un ribosoma. Un ribosoma bacteriano comprende aproximadamente 22 proteínas en la subunidad pequeña (proteínas S1 a S22) y aproximadamente 34 proteínas en la subunidad grande (proteínas L1 a L36). Una proteína ribosómica se halla en ambas subunidades (S20 o L26 son por lo tanto idénticas), L7 y L12 son formas acetiladas y metiladas de la misma proteína, y L8 es un complejo de L7/L12 y L10. Además, L31 existe en dos formas, en concreto como proteína de longitud completa (7,9 Kilodalton (kDa) y en forma acortada (7,0 kDa). Por lo tanto, en un ribosoma bacteriano están contenidas en total 56 proteínas. Con excepción de S1 (con un peso molecular de 61,2 kDa), las otras proteínas ribosómicas presentan pesos moleculares entre 4,4 y 29,7 kDa. En la subunidad ribosómica pequeña, las proteínas S4, S7, S8, S15, S17 y S20 se unen independientemente entre sí al ARNr 16S. Según el ensamblaje de esta unidad primaria, S5, S6, S9, S12, S13, S16, S18 y S19 se unen al ribosoma en crecimiento. Estas proteínas soportan también la adición de S2, S3, S10, S11, S14 y S21. Las proteínas ribosómicas contienen por regla general dominios compactos, globulares. Así mismo, contienen también segmentos largos que pueden interaccionar con el ARNr. La proteína ribosómica S2 es por lo tanto un constituyente de la subunidad ribosómica pequeña de un ribosoma bacteriano.

De manera especialmente preferente, el promotor de rpsB en *Bacillus subtilis* provoca naturalmente la transcripción de un gen que codifica para la proteína ribosómica S2 de *Bacillus subtilis* o que es necesario para ella. La proteína ribosómica S2 de *Bacillus subtilis* se encuentra por ejemplo disponible bajo la entrada en el banco de datos P21464 del banco de datos de acceso público UniProtKB/Swiss-Prot (EMBL Gutstation, European Bioinformatics Institute (EBI), Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton Cambridge CB10 1SD, Reino Unido).

Además de los dos promotores, un ácido nucleico de acuerdo con la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido. Para ello puede usarse en principio cualquier secuencia de ácido nucleico que puede traducirse en un polipéptido.

La primera secuencia promotora y la segunda secuencia promotora se encuentran una tras otra en la molécula de ácido nucleico. La segunda secuencia promotora se encuentra delante de la primera secuencia promotora en la molécula de ácido nucleico (en orientación 5' → 3'). Preferentemente, entre las dos secuencias promotoras (a) y (b) no se encuentra ninguna secuencia de ácido nucleico que reduce la frecuencia de transcripción de la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido. Así mismo, entre las dos secuencias promotoras (a) y (b) se encuentra como máximo 500 y de manera progresiva preferentemente como máximo 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 nucleótidos. De manera especialmente preferente, las dos secuencias promotoras en la molécula de ácido nucleico se encuentran delante de la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido en orientación 5' → 3'. De manera muy especialmente preferente, así mismo entre la primera secuencia promotora (a) y la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido se encuentran como máximo 500 y de manera progresiva preferentemente como máximo 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 nucleótidos. Todos los datos anteriores se refieren a la hebra de ADN que incluye la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido y no a la hebra de ADN codogénica correspondiente. A partir de la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido se encuentran las dos secuencias promotoras por lo tanto más aguas abajo, es decir en sentido 3', en esta hebra de DNA con las medidas mencionadas anteriormente.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención se caracteriza porque es un ácido nucleico no natural. No natural significa que un ácido nucleico de acuerdo con la invención no puede aislarse a partir de un organismo presente en la naturaleza en su forma de tipo natural. En particular y con respecto a bacterias de tipo natural, un ácido nucleico de acuerdo con la invención no es por lo tanto un ácido nucleico propio de una bacteria. Más bien, un ácido nucleico de acuerdo con la invención es el resultado de una modificación de ingeniería genética, es decir un ácido nucleico de acuerdo con la invención se generó con ayuda de procedimientos de ingeniería genética mediante combinación de las secuencias génicas (a) y/o (b) y/o (c). Los ácidos nucleicos presentes en la naturaleza, por ejemplo el ADN genómico de bacterias, no son por lo tanto objeto de la invención.

Preferentemente, las secuencias (a) y/o (b) y/o (c) no proceden del mismo o de los mismos organismo(s), en particular bacterias, sino que proceden de organismos diferentes, en particular bacterias. Bacterias diferentes son por ejemplo bacterias que pertenecen a diferentes cepas o especies o géneros.

En una forma de realización adicional de la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención se caracteriza porque la primera secuencia promotora y la segunda secuencia promotora están funcionalmente acopladas de tal manera que provocan una expresión aumentada de la secuencia de ácido nucleico (c) en una célula huésped en comparación con una célula huésped, en la que tiene lugar la expresión de la secuencia de ácido nucleico (c) con solo una de las secuencias promotoras a) o b).

Este hecho se determina a través de la frecuencia de transcripción de la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido, es decir, a través del número de moléculas de ARN generadas por unidad de tiempo. La actividad promotora conjunta de las secuencias promotoras primera y segunda aumenta por consiguiente la actividad promotora de la primera secuencia promotora o de la segunda secuencia promotora. De igual modo, puede compararse cuántos polipéptidos correspondientes se forman por unidad de tiempo. En el último caso se incluye por lo tanto la etapa de traducción en la determinación de la expresión. En el caso de un ácido nucleico de acuerdo con la invención, los dos promotores provocan por lo tanto un aumento de la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido y con ello, que esta secuencia de ácido nucleico se traduzca con mayor frecuencia en ARN que en el caso de un ácido nucleico comparativo que, si bien comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido, en cambio solo uno de los dos promotores. En el caso del ácido nucleico comparativo, el promotor provoca por lo tanto igualmente una expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido, sin embargo esta secuencia de ácido nucleico se traduce con menor frecuencia en ARN que en el caso de un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Una comparación de este tipo tiene lugar de acuerdo con la invención en células huésped del mismo tipo, para garantizar la comparabilidad de las mediciones. Preferentemente, el acoplamiento funcional se consigue porque la primera secuencia promotora (a) y/o la segunda secuencia promotora (b) y/o la secuencia de ácido nucleico (c) que codifica para el polipéptido están dispuestas sobre o dentro de la molécula de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden generarse a través de procedimientos en sí conocidos para modificar ácidos nucleicos. Estos se describen por ejemplo en los manuales correspondientes tales como el de Fritsch, Sambrook y Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989. Ejemplos de procedimientos de este tipo son la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), opcionalmente en conexión con métodos convencionales de biología molecular y/o químicos o bioquímicos.

En una forma de realización separada de la invención, el ácido nucleico se caracteriza porque el promotor del gen

subC que codifica para subtilisina Carlsberg está naturalmente presente en *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans* o *Bacillus pumilus* y/o el promotor del gen *rpsB* que codifica para la proteína ribosómica S2 está naturalmente presente en *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans* o *Bacillus pumilus*.

En una forma de realización adicional, el ácido nucleico se caracteriza porque la segunda secuencia promotora b) comprende una secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la SEQ ID NO. 6 en las posiciones 7 a 234 de manera progresiva preferentemente en al menos el 78,5 %, 80 %, 82,5 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 % y de manera muy especialmente preferente en el 100 %.

Se ha comprobado que los promotores de este tipo son especialmente adecuados para provocar una elevada expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido y con ello un alto rendimiento de producto.

La determinación de la identidad tiene lugar mediante comparación de secuencias. Una comparación de este tipo se produce porque sucesiones similares en las secuencias de nucleótidos (o también secuencias de aminoácidos) se asocian entre sí. Una asociación tabular de las posiciones en cuestión se denomina alineamiento. En el análisis de secuencias de nucleótidos han de tenerse en cuenta a su vez ambas hebras complementarias y en cada caso los tres posibles marcos de lectura; así mismo la capacidad de degeneración del código genético y el uso específico de organismo del codón (*Codon-Usage*). Entretanto, se crean alineamientos a través de programas informáticos, tales como por ejemplo mediante los algoritmos FASTA o BLAST; este modo de proceder se describe por ejemplo por D. J. Lipman y W. R. Pearson (1985) en *Science*, volumen 227, páginas 1435-1441.

Una compilación de todas las posiciones coincidentes en las secuencias comparables se denomina secuencia consenso.

Una comparación de este tipo permite también una declaración sobre la similitud o la homología de las secuencias comparadas entre sí. Esta se expresa en porcentaje de identidad, es decir, el porcentaje de los nucleótidos o restos de aminoácido idénticos en las mismas posiciones o en posiciones correspondientes a un alineamiento entre sí. Un concepto de homología abarcado adicionalmente incluye, en el caso de secuencias de aminoácidos, sustituciones de aminoácidos conservadas en este valor. Se habla entonces de porcentaje de similitud. Declaraciones de este tipo pueden afectar a polipéptidos o genes completos o solo a regiones individuales.

Regiones homólogas o idénticas de distintas secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos están definidas por coincidencias en las secuencias. Estas pueden caracterizarse también por una función idéntica. Esta va hasta identidades completas en las regiones más pequeñas, las denominadas cajas, que solo comprenden algunos nucleótidos o aminoácidos y ejercen en la mayoría de los casos funciones esenciales para la actividad total. Ejemplos de funciones de este tipo pueden ser, en el caso de los ácidos nucleicos, la interacción con moléculas especiales, por ejemplo en el caso de secuencias promotoras la interacción con determinados factores de transcripción. En el caso de secuencias de aminoácidos, tales funciones también las funciones parciales más pequeñas de la función ejercida por el polipéptido completo pueden entenderse como por ejemplo la formación de enlaces por puentes de hidrógeno individuales para la complejación de un sustrato o complejo de transición.

En una forma de realización adicional de la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención se caracteriza porque la secuencia de ácido nucleico c) codifica para una enzima, en particular para una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanas, xantanasa, β -glucosidasa, carragenasa, oxidasa, oxidorreductasa o lipasa. Las enzimas de este tipo se preparan preferentemente con un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Enzimas especialmente preferidas, que pueden prepararse con un ácido nucleico de acuerdo con la invención, se describen a continuación. Para todas las moléculas mencionadas, su secuencia de ácido nucleico o bien se divulga en el estado de la técnica o bien puede determinarse de manera unívoca a través de medidas rutinarias habituales en la técnica de la secuenciación, de modo que el experto obtiene una secuencia que puede introducir como secuencia de ácido nucleico c) en un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el experto puede, a partir de un producto comercial, en este caso un polipéptido, determinar su secuencia de aminoácidos y traducir la misma a su vez, basándose en el código genético, en una secuencia de ácido nucleico.

Entre las proteasas se prefieren aquellas del tipo subtilisina. Ejemplos de ellas son las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa P892, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, subtilisina DY y las enzimas que van a asociarse a las subtilisinas, pero ya no las subtilisinas en el sentido estricto termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7. La subtilisina Carlsberg puede obtenerse en forma desarrollada con el nombre comercial Alcalase® de la empresa Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca. Las subtilisinas 147 y 309 se comercializan con los nombres comerciales Esperase®, o Savinase® de la empresa Novozymes. De la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483 se derivan las variantes de proteasa registradas bajo el nombre BLAP®. Otras proteasas que pueden usarse son por ejemplo enzimas que pueden obtenerse con los nombres comerciales Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym®, Natalase®, Kannase® y Ovozyme® de la empresa Novozymes, las enzimas que pueden obtenerse con los nombres comerciales Purafect®, Purafect® OxP, Purafect® Prime, Excellase® y Properase® de

la empresa Genencor, la enzima que puede obtenerse con el nombre comercial Protosol® de la empresa Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, la enzima que puede obtenerse con el nombre comercial Wuxi® de la empresa Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, las enzimas que pueden obtenerse con los nombres comerciales Proleather® y Protease P® de la empresa Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japón, y la enzima que puede obtenerse con el nombre proteinasa K-16 de la empresa Kao Corp., Tokio, Japón. De manera especialmente preferente se emplean también las proteasas de *Bacillus gibsonii* y *Bacillus pumilus*, que se divulgan en las solicitudes de patente internacionales WO 2008/086916 y WO 2007/131656.

Ejemplos de amilasas son las α -amilasas de *Bacillus licheniformis*, de *B. amyloliquefaciens* o de *B. stearothermophilus* así como sus perfeccionamiento mejorado para el uso en agentes de lavado o de limpieza. La enzima de *B. licheniformis* puede obtenerse de la empresa Novozymes con el nombre Termamyl® y de la empresa Genencor con el nombre Purastar®ST. Los productos de perfeccionamiento de esta α -amilasa pueden obtenerse de la empresa Novozymes con los nombres comerciales Duramyl® y Termamyl®ultra, de la empresa Genencor con el nombre Purastar®OxAm y de la empresa Daiwa Seiko Inc., Tokio, Japón, como Keistase®. La α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* se comercializa por la empresa Novozymes con el nombre BAN®, y variantes derivadas de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con los nombres BSG® y Novamyl®, igualmente de la empresa Novozymes.

Además, para este fin, se ponen de relieve la α -amilasa de *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) y la ciclodextrina-glucanotransferasa (CGTasa) de *B. agaradherens* (DSM 9948). Así mismo pueden emplearse las enzimas amilolíticas, que pertenecen al espacio de secuencias de α -amilasas, que se define en la solicitud de patente internacional WO 03/002711 A2, y las que se describen en la solicitud WO 03/054177 A2. Así mismo pueden emplearse productos de fusión de las moléculas mencionadas.

Además son adecuados los perfeccionamientos que pueden obtenerse con los nombres comerciales Fungamyl® de la empresa Novozymes de la α -amilasa de *Aspergillus niger* y *A. oryzae*. Productos comerciales que pueden emplearse adicionales son por ejemplo Amylase-LT® y Stainzyme® o Stainzyme ultra® o Stainzyme plus®, estas últimas igualmente de la empresa Novozymes. También variantes de estas enzimas que pueden obtenerse mediante mutaciones puntuales pueden emplearse de acuerdo con la invención.

Ejemplos de lipasas o cutinasas, que están contenidas en particular debido a sus actividades de escisión de triglicéridos, pero también, para generar péridos a partir de precursores adecuados *in situ*, pueden obtenerse las lipasas que pueden obtenerse originalmente a partir de *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), o perfeccionadas, en particular aquellas con la sustitución de aminoácidos D96L. Estas se comercializan por ejemplo de la empresa Novozymes con los nombres comerciales Lipolase®, Lipolase®Ultra, LipoPrime®, Lipozyme® y Lipex®. Además pueden emplearse por ejemplo las cutinasas, que se han aislado originalmente a partir de *Fusarium solani* pisi y *Humicola insolens*. Lipasas que pueden usarse así mismo pueden obtenerse de la empresa Amano bajo las denominaciones Lipase CE®, Lipase P®, Lipase B® o Lipase CES®, Lipase AKG®, *Bacillus* sp. Lipase®, LipaseAP®, Lipase M-AP® y Lipase AML®. De la empresa Genencor pueden emplearse por ejemplo las lipasas o cutinasas, cuyas enzimas de partida se han aislado originalmente a partir de *Pseudomonas mendocina* y *Fusarium solanii*. Como productos comerciales importantes adicionales pueden mencionarse las preparaciones comercializadas originalmente por la empresa Gist-Brocades M1 lipasa® y Lipomax® y las enzimas comercializadas por la empresa Meito Sangyo KK, Japón, con los nombres Lipase MY-30®, Lipase OF® y Lipase PL®, así mismo el producto Lumafast® de la empresa Genencor.

Los ejemplos de celulasas comprenden una preparación de celulasa rica en endoglucanasa (EG), o sus perfeccionamientos, que se ofrecen por la empresa Novozymes con el nombre comercial Celluzyme®. Los productos que pueden obtenerse igualmente de la empresa Novozymes Endolase® y Carezyme® se basan en 50 kD-EG, o 43 kD-EG de *H. insolens* DSM 1800. Productos comerciales que pueden emplearse adicionales de esta empresa son Cellusoft®, Renozyme® y Cellucan®. Además pueden emplearse por ejemplo 20 kD-EG de *Melanocarpus*, que pueden obtenerse de la empresa AB Enzymes, Finlandia, con los nombres comerciales Ecostone® y Biotouch®. Productos comerciales adicionales de la empresa AB Enzymes son Econase® y Ecopulp®. Celulasas adecuadas adicionales son de *Bacillus* sp. CBS 670.93 y CBS 669.93, pudiendo obtenerse la de *Bacillus* sp. CBS 670.93 de la empresa Genencor con el nombre comercial Puradax®. Productos comerciales adicionales de la empresa Genencor son "Genencor detergent cellulase L" e IndiAge®Neutra.

Entre las hemicelulasas figuran por ejemplo manasas, xantanilasas (xantanastas), pectinilasas (=pectinasas), pectinesterasas, pectatilasas, xiloglucanasas (=xilanasas), pululanastas y β -glucanasas. Enzimas adecuadas a este respecto pueden obtenerse por ejemplo con los nombres Gamanase® y Pektinex AR® de la empresa Novozymes, con el nombre Rohapec® B1 L de la empresa AB Enzymes y con el nombre Pyrolase® de la empresa Diversa Corp., San Diego, CA, EE.UU. La β -glucanasa obtenida a partir de *Bacillus subtilis* puede obtenerse con el nombre Cereflo® de la empresa Novozymes. Hemicelulasas especialmente preferidas de acuerdo con la invención son manasas, que se comercializan por ejemplo con los nombres comerciales Mannaway(R) de la compañía Novozymes o Purabrite® de la compañía Genencor.

Las oxidorreductasas comprenden por ejemplo oxidasas, oxigenasas, catalasas (que reaccionan a bajas concentraciones de H₂O₂ como peroxidasa), peroxidasas, tales como halo-, cloro-, bromo-, lignin-, glucosa- o manganoperoxidadas, dioxigenasas o lacasas (fenoloxidasas, polifenoloxidasas). Como productos comerciales

adecuados pueden mencionarse Denilite® 1 y 2 de la empresa Novozymes. Ejemplos adicionales de oxidasas se divulgan como componentes para una perhidrólisis enzimática en las solicitudes de patente internacionales WO 98/45398 A1, WO 2005/056782 A2 así como WO 2004/058961 A1. La solicitud WO 2005/124012 describe un sistema blanqueante enzimático, combinado, que comprende una oxidasa y una perhidrolasa.

- 5 Los ácidos nucleicos, que codifican para enzimas preferidas de acuerdo con la invención, proceden originalmente o bien a partir de microorganismos, por ejemplo de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, *Escherichia* o *Pseudomonas*, y/o se obtuvieron de manera recombinante de acuerdo con procedimientos biotecnológicos en sí conocidos en microorganismos adecuados, por ejemplo en bacterias de los géneros *Bacillus* o en hongos filamentosos.
- 10 Con todos los objetos de la invención mencionados y formas de realización están relacionados como objetos de la invención adicionales vectores, células huésped, procedimientos de preparación correspondientes, en los que se emplean vectores o células huésped correspondientes así como usos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped correspondientes. Por lo tanto, las realizaciones anteriores se refieren de manera correspondiente a estos objetos de la invención.
- 15 Un objeto adicional de la invención es por lo tanto un vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.

Por vectores se entienden en el sentido de la presente invención elementos compuestos por ácidos nucleicos, que contienen como región de ácido nucleico caracterizadora, un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Estos pueden estabilizar la misma en una especie o una línea celular a través de varias generaciones o divisiones

- 20 celulares como elemento genético estable. Los vectores son en particular, en el caso del uso en bacterias, plásmidos especiales, es decir, elementos genéticos circulares. En la ingeniería genética se diferencia por un lado entre aquellos vectores que sirven para el almacenamiento y por lo tanto, en cierta medida, también para el trabajo de ingeniería genética, los denominados vectores de clonación y, por otro lado, aquellos que cumplen la función de realizar el gen de interés en la célula huésped, es decir, permitir la expresión del polipéptido en cuestión. Estos
- 25 vectores se denominan vectores de expresión.

En el contexto de la presente invención se clona un ácido nucleico de acuerdo con la invención de manera adecuada en un vector. A estos pueden pertenecer por ejemplo aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o vectores o plásmidos principalmente sintéticos con elementos de distinto origen. Con los elementos genéticos adicionales presentes en cada caso pueden establecerse vectores en las células huésped en cuestión a lo

- 30 largo de varias generaciones como unidades estables. A este respecto es insignificante en el sentido de la invención, si se encuentran de manera extracromosómica como unidades propias o se integran en un cromosoma o ADN cromosómico. Cuál de los numerosos sistemas conocidos del estado de la técnica se selecciona, depende del caso individual. Pueden ser decisivos por ejemplo el número de copias alcanzable, los sistemas de selección disponibles, entre ellos sobre todo resistencias a antibióticos, o la capacidad de cultivo de las células huésped capaces de absorber los vectores.
- 35

Los vectores de expresión comprenden secuencias parciales que son capaces de replicar células huésped que los contienen, preferentemente microorganismos, de manera especialmente preferente bacterias, y llevar a la expresión el gen allí contenido. La expresión se ve afectada en particular por los promotores que regulan la transcripción del gen. En principio, la expresión puede tener lugar mediante el promotor natural, localizado originalmente delante del

- 40 gen que va a expresarse, pero también tras la fusión por ingeniería genética tanto mediante un promotor proporcionado sobre el vector de expresión de la célula huésped como mediante un promotor modificado o u otro totalmente distinto de otro organismo u otra célula huésped. En el presente caso se proporcionan al menos dos promotores ya mediante un ácido nucleico de acuerdo con la invención y se usan para la expresión de la secuencia de ácido nucleico c).

Los vectores de expresión pueden ser regulables a través de cambios de las condiciones de cultivo o la adición de determinados compuestos, tales como por ejemplo la densidad celular o factores especiales. Los vectores de expresión permiten que el polipéptido correspondiente se produzca de manera heteróloga, es decir, en otra célula o célula huésped distinta de la que puede obtenerse naturalmente. Las células pueden pertenecer a este respecto a distintos organismos o proceder de distintos organismos. También es posible una obtención homóloga del

- 50 polipéptido a partir de una célula huésped que expresa naturalmente el gen a través de un vector de acuerdo con la invención. Esto puede presentar la ventaja de que se realizan reacciones de modificación naturales, relacionadas con la traducción, en el polipéptido que se genera de la misma manera que transcurriría también naturalmente.

A un sistema de expresión que puede emplearse pueden pertenecer así mismo genes adicionales, por ejemplo aquellos que se encuentran disponibles en otros vectores, y que influyen en la producción de los polipéptidos de acuerdo con la invención. En este sentido puede tratarse de productos génicos de modificación o de aquellos que se purificarán conjuntamente con el polipéptido que se codifica por la secuencia de ácido nucleico c), por ejemplo para influir en su función enzimática. A este respecto puede tratarse por ejemplo de otras proteínas o enzimas, de inhibidores o de aquellos elementos que influyen en la interacción con distintos sustratos.

Un objeto adicional de la invención es una célula huésped no humana que incluye un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. Un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención se introduce preferentemente en la célula huésped mediante su transformación. De acuerdo con la invención preferentemente esto tiene lugar porque se transforma un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención en un microorganismo que entonces representa una célula huésped de acuerdo con la invención. Como alternativa pueden introducirse también componentes individuales, es decir partes o fragmentos de ácido nucleico, por ejemplo los componentes (a) y/o (b) y/o (c) de un ácido nucleico de acuerdo con la invención, en una célula huésped de tal manera que la célula huésped entonces resultante contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. Este modo de proceder es especialmente adecuado cuando la célula huésped contiene ya uno o varios constituyentes de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o de un vector de acuerdo con la invención y los constituyentes adicionales se completan entonces de manera correspondiente. Los procedimientos para la transformación de células están establecidos en el estado de la técnica y son suficientemente conocidos por el experto. Como células huésped son adecuadas en principio todas las células, es decir, células procariotas o eucariotas. Se prefieren aquellas células huésped que pueden manipularse genéticamente de manera ventajosa, lo que afecta por ejemplo a la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable, por ejemplo hongos unicelulares o bacterias. Así mismo las células huésped se caracterizan preferentemente por una buena capacidad de manipulación microbiológica y biotecnológica. Esto se refiere por ejemplo a una fácil capacidad de cultivo, altas tasas de crecimiento, bajos requisitos en cuanto a los medios de fermentación y buenas tasas de producción y secreción para proteínas extrañas. Con frecuencia, de la abundancia de distintos sistemas disponibles en el estado de la técnica, deben determinarse experimentalmente los sistemas de expresión óptimos para el caso individual.

Representan formas de realización preferidas adicionales aquellas células huésped que, debido a elementos de regulación genéticos, que se encuentran disponibles por ejemplo sobre el vector, pero también pueden estar presentes en estas células a priori, pueden regularse en su actividad. Por ejemplo mediante la adición controlada de compuestos químicos, que sirven como activadores, mediante el cambio de las condiciones de cultivo o al alcanzar una densidad celular determinada, pueden estimularse estas para la expresión. Esto permite una producción rentable de los polipéptidos de acuerdo con la invención.

Las células huésped preferidas son células procariotas o bacterianas. Las bacterias se caracterizan por cortos tiempos de generación y bajos requisitos en cuanto a las condiciones de cultivo. De esta manera pueden establecerse procedimientos económicos. Además, el experto, en el caso de las bacterias en la técnica de fermentación, dispone de una rica experiencia. Para una producción especial, por los más diversos motivos, a determinar experimentalmente en el caso individual, tal como fuentes de nutrientes, tasa de formación de producto, tiempo requerido, etc., son adecuadas bacterias Gram negativas o Gram positivas.

En el caso de bacterias Gram negativas, tales como por ejemplo *Escherichia coli*, se disecciona una pluralidad de polipéptidos en el espacio periplasmático, es decir, en el compartimento entre las dos membranas que envuelven las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Así mismo también las bacterias Gram negativas pueden diseñarse de modo que estas descarguen los polipéptidos expresados no solo en el espacio periplasmático, sino en el medio que rodea a la bacteria. Bacterias Gram positivas tales como por ejemplo *Bacilli* o *Actinomyceten* u otros representantes de los *Actinomycetales* no tienen por el contrario ninguna membrana exterior, de modo que los polipéptidos cortados se desprenden inmediatamente al medio que rodea a las bacterias, por regla general el medio nutriente, en el que pueden purificarse los polipéptidos expresados. Estos pueden aislarse directamente del medio o procesarse adicionalmente. Además, las bacterias Gram positivas son idénticas o están relacionadas con la mayoría de los organismos de origen para enzimas importantes y forman en la mayoría de los casos enzimas en sí comparables, de modo que disponen de un uso de codones (*Codon-Usage*) similar y su aparato de síntesis de proteínas está naturalmente ajustado de manera correspondiente.

Por uso de codones se entiende la traducción del código genético en aminoácidos, es decir qué serie de nucleótidos (triplete o triplete de bases) para qué aminoácido o para qué función, por ejemplo inicio y final de la región que va a traducirse, sitios de unión para distintas proteínas, etc., codifica. De este modo, cada organismo, en particular cada cepa de producción, tiene un determinado uso de codones. Pueden aparecer dificultades en la biosíntesis de proteínas, cuando los codones situados sobre ácido nucleico transgénico en la célula huésped se enfrentan a un número comparativamente menor de ARNt cargados. Los codones sinónimos codifican por el contrario para los mismos aminoácidos y pueden traducirse de un mejor modo dependiendo del huésped. Esta transcripción opcionalmente necesaria depende por lo tanto de la elección del sistema de expresión. En particular en el caso de muestras de organismos desconocidos, eventualmente no cultivables, puede ser necesaria una adaptación correspondiente.

La presente invención puede aplicarse en principio en todos los microorganismos, en particular en todos los microorganismos fermentables, de manera especialmente preferente en aquellos del género *Bacillus*, y lleva a que mediante el uso de tales microorganismos como organismos de producción pueda producirse un rendimiento de producto elevado en una fermentación. Los microorganismos de este tipo representan entonces células huésped en el sentido de la invención.

En una forma de realización adicional de la invención, la célula huésped se caracteriza por lo tanto porque es una

bacteria, preferentemente una que se selecciona del grupo de los géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, más preferentemente una, que se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

La célula huésped puede ser también una célula eucariota, que se caracteriza porque tiene un núcleo celular. Por lo tanto, representa un objeto adicional de la invención una célula huésped que se caracteriza porque tiene un núcleo celular.

En contraposición a las células procariotas, las células eucariotas pueden modificar el polipéptido formado de manera postraducciona. Ejemplos de ello son hongos tales como actinomicetos o levaduras tales como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser especialmente ventajoso por ejemplo cuando los polipéptidos deben experimentar modificaciones específicas en relación con su síntesis, que permiten sistemas de este tipo. A las modificaciones, que llevan a cabo sistemas eucariotas especialmente en relación con la síntesis de proteínas, pertenece por ejemplo la unión de compuestos de bajo peso molecular tales como anclajes de membrana u oligosacáridos. Modificaciones de oligosacáridos de este tipo pueden ser deseables por ejemplo para la reducción de la alergenicidad de un polipéptido expresado. También puede ser ventajosa una coexpresión con las enzimas formadas naturalmente por células de este tipo, tales como por ejemplo celulasas. Así mismo, por ejemplo sistemas de expresión de hongos termófilos pueden ser especialmente adecuados para la expresión de variantes resistentes a la temperatura.

Como productos que se forman durante la fermentación, se consideran de acuerdo con la invención polipéptidos o proteínas que se codifican por la secuencia de ácido nucleico (c). Preferentemente se trata en este caso de enzimas.

Las células huésped pueden modificarse así mismo con respecto a sus requisitos en cuanto a las condiciones de cultivo, presentar otros marcadores de selección o marcadores de selección adicionales o expresar otras proteínas o proteínas adicionales. Puede tratarse en particular de aquellas células huésped que expresan varias proteínas o enzimas. Preferentemente estas se cortan en el medio que rodea las células huésped.

Las células huésped de acuerdo con la invención se cultivan y fermentan de manera en sí conocida, por ejemplo en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso se inocula un medio nutriente adecuado con las células huésped y se recoge del medio el producto tras un periodo de tiempo que ha de determinarse experimentalmente. Fermentaciones continuas se caracterizan por alcanzar un equilibrio de flujo, en el que a lo largo de un periodo de tiempo relativamente largo, las células mueren parcialmente pero también se reproducen y al mismo tiempo puede extraerse producto del medio.

Las células huésped de acuerdo con la invención se usan preferentemente para producir polipéptidos o proteínas que se codifican por la secuencia de ácido nucleico (c). Un objeto adicional de la invención es por lo tanto un procedimiento para la preparación de un polipéptido que comprende

- a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la invención
- b) aislar el polipéptido del medio de cultivo o de la célula huésped.

Este objeto de la invención abarca preferentemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación son en sí conocidos por el estado de la técnica y representan la verdadera etapa de producción a escala industrial, por regla general seguida de un método de purificación adecuado del producto producido, por ejemplo del polipéptido. Todos los procedimientos de fermentación que se basan en un procedimiento correspondiente para la preparación de un polipéptido, representan formas de realización de este objeto de la invención.

En este caso, deben determinarse experimentalmente las condiciones óptimas en cada caso para los procedimientos de preparación, en particular las condiciones de cultivo óptimas para las células huésped usadas, según los conocimientos del experto, por ejemplo en cuanto al volumen de fermentación y/o la composición del medio y/o el suministro de oxígeno y/o la velocidad del agitador.

Los procedimientos de fermentación, que se caracterizan porque la fermentación se lleva a cabo a través de una estrategia de suministro, se tienen igualmente en cuenta. En este caso se alimentan los constituyentes del medio, que se consumen para el cultivo continuo; se habla también de una estrategia de alimentación. Con ello pueden alcanzarse aumentos considerables tanto en la densidad celular como en la masa celular o masa seca y/o sobre todo la actividad del péptido de interés.

De manera análoga a esto, la fermentación puede configurarse también de modo que se separen por filtración los productos metabólicos indeseados o se neutralicen mediante la adición de tampón o en cada caso contraiones adecuados.

El polipéptido preparado puede recogerse del medio de fermentación. Un procedimiento de fermentación de este

tipo se prefiere con respecto a un aislamiento del polipéptido de la célula huésped, es decir una preparación de producto a partir de la masa celular (masa seca), sin embargo requiere la provisión de uno o varios marcadores o mecanismos de secreción y/o sistemas de transporte adecuados. Sin secreción, el aislamiento del polipéptido puede tener lugar a partir de la célula huésped, es decir una purificación del polipéptido a partir de la masa celular. También para ello se conocen distintos procedimientos, tales como precipitación, por ejemplo, mediante sulfato de amonio o etanol, o la purificación cromatográfica.

Todas las circunstancias expuestas anteriormente pueden combinarse para dar procedimientos para preparar polipéptidos de acuerdo con la invención. A este respecto es concebible una pluralidad de posibilidades de combinación de etapas de procedimiento. El procedimiento óptimo debe determinarse para cada caso individual concreto. Así mismo, en los procedimientos mencionados, el ácido nucleico de acuerdo con la invención contenido en la célula huésped, en particular la secuencia de ácido nucleico (c), en un codón, preferentemente varios codones, puede haberse adaptado al uso de codones de la célula huésped.

Preferentemente, en el caso de un polipéptido producido de acuerdo con la invención se trata de una enzima. De manera especialmente preferente se trata de una enzima que se selecciona del grupo que consiste en proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, β -glucosidasa, carragenasa, oxidasa, oxidoreductasa, lipasa, o combinaciones de las mismas. De manera muy especialmente preferente, en el caso de la enzima se trata de una de las enzimas descritas anteriormente.

Las células huésped de acuerdo con la invención se usan ventajosamente en los procedimientos de acuerdo con la invención descritos, para preparar un polipéptido. Consecuentemente, es por consiguiente un objeto adicional de la invención el uso de una célula huésped descrita anteriormente para la preparación de un polipéptido. Dado que las células huésped de acuerdo con la invención comprenden un vector de acuerdo con la invención o un ácido nucleico de acuerdo con la invención, objetos adicionales de la invención son el uso de un vector descrito anteriormente para la preparación de un polipéptido o el uso de un ácido nucleico descrito anteriormente para la preparación de un polipéptido.

Todas las circunstancias, objetos y formas de realización, que se han descrito anteriormente, pueden emplearse también en estos objetos de la invención. Por lo tanto, en este punto se remite expresamente a la divulgación en el sitio correspondiente con la indicación de que esta divulgación también es válida para los usos de acuerdo con la invención (uso de la célula huésped o del vector o del ácido nucleico).

Los siguientes ejemplos explican la presente invención adicionalmente, sin limitarla a los mismos.

Ejemplos

Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen métodos convencionales, tal como están indicados por ejemplo en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, u obras pertinentes comparables. Las enzimas y juegos de construcción (kits) se emplearon según las instrucciones de los fabricantes respectivos.

Ejemplo 1: Producción fermentativa de una primera proteasa (variante mejorada en rendimiento de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, que se divulga en el documento EP 0701605, denominada en adelante proteasa 1) con ayuda del promotor tandem P_{rpsB} - P_{subC}

a) Construcción de plásmido de producción

Se sintetizó un fragmento de ADN de 240 pb (SEQ ID NO. 6), que comprende el promotor del gen 168 rpsB de *Bacillus subtilis* (posiciones 7 a 234) y se flanquea por los sitios de restricción NdeI y BamHI. La ligación del fragmento de ADN cortado con las endonucleasas de restricción NdeI y BamHI en el plásmido 1 cortado con las mismas endonucleasas de restricción dio como resultado el plásmido 1_ P_{rpsB} tal como se indica en la Figura 1. En este plásmido se encuentra el promotor de rpsB P_{rpsB} directamente delante del promotor de subC P_{subC} , de modo que ambos promotores controlan la expresión de la proteasa 1 (véase 1). Como promotor de subC se usó el promotor denominado "ATCC 53926 alkaline protease gene promoter" según el documento WO 91/02792. Una cepa de *Bacillus licheniformis* se transformó con el plásmido plásmido 1_ P_{rpsB} , para obtener la cepa de protección de proteasa 1 "cepa 1".

b) Producción fermentativa de la proteasa 1

La cepa 1 se empleó en un procedimiento de fermentación convencional. En comparación con la cepa de partida, que incluye únicamente plásmido 1 con el promotor de subC sin promotor de rpsB, el rendimiento aumenta en el fermentador de laboratorio de 2 l en un 24,1 % (valor medio de tres fermentaciones independientes).

Ejemplo 2: Producción fermentativa de una segunda proteasa (proteasa de *Bacillus pumilus* según el documento WO 2007/131656, denominada a continuación proteasa 2) con ayuda del promotor tandem P_{rpsB} - P_{subC}

a) Construcción de plásmido de producción

El fragmento de ADN de aproximadamente 1,3 kb obtenido mediante restricción con las endonucleasas de restricción Clal y SacI del plásmido de producción de proteasa 2 plásmido 2, que contiene la secuencia de ADN del propéptido y la proteasa 2 madura (*mature*), se ligó en los sitios de restricción correspondientes del fragmento de ADN de aproximadamente 4,0 kb del plásmido plásmido 1_P_{rpsB} tal como se indica en 2. En el plásmido resultante 2_P_{rpsB}, el promotor de rpsB R_{rpsB} se encuentra directamente delante del promotor de subC P_{subC}, de modo que ambos promotores controlan ahora la expresión de la proteasa 2 (véase 2). Como promotor de subC se usó el promotor denominado "ATCC 53926 *alkaline protease gene promotor*" según el documento WO 91/02792. Una cepa de *Bacillus licheniformis* se transformó con el plásmido 2_P_{rpsB}, para obtener la cepa de producción de proteasa 2 "cepa 2".

b) Producción fermentativa de la proteasa 2

La cepa 2 se empleó con un procedimiento de fermentación convencional. En comparación con la cepa de partida, que incluye únicamente plásmido 2 con el promotor de subC sin promotor de rpsB, el rendimiento en el fermentador de laboratorio de 2 l aumenta en un 38 % (valor medio de 2 fermentaciones independientes).

Descripción de las Figuras

La Figura 1: construcción del plásmido 1_P_{rpsB} mediante inserción de un fragmento de ADN NdeI-BamHI, que comprende el promotor de rpsB, en los sitios de restricción correspondientes del plásmido de producción de proteasa 1 "plásmido 1".

La Figura 2: construcción del plásmido 2_P_{rpsB} mediante ligación del fragmento de ADN Clal-SacI de aproximadamente 1,3 kb, que comprende la secuencia génica de la proteasa 2, en los sitios de restricción correspondientes del plásmido de producción plásmido 1_P_{rpsB} (fragmento de ADN de aproximadamente 4,0 kb).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Ácidos nucleicos con expresión aumentada

<130> H 08172

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región consenso -35-

<400> 1

ttgaca 6

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región consenso -10-

<400> 2

tataat 6

<210> 3

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> -10-Region subC

	<400> 3	
	tacaat	6
	<210> 4	
	<211> 6	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> -35-Region subC	
	<400> 4	
10	tactaa	6
	<210> 5	
	<211> 274	
	<212> PRT	
	<213> <i>Bacillus licheniformis</i>	
15	<400> 5	

Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys	Val	1	5	10	15
Gln	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp	20	25	30	
Thr	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Ala	35	40	45	
Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Glu	Ala	Tyr	Asn	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	50	55	60	
Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Thr	Gly	Val	65	70	75	80
Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Asn	85	90	95	
Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Ile	Glu	Trp	100	105	110	
Ala	Thr	Thr	Asn	Gly	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Met	Lys	Gln	Ala	Val	Asp	Asn	Ala	Tyr	Ala	Arg	130	135	140	
Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Asn	145	150	155	160
Thr	Asn	Thr	Ile	Gly	Tyr	Pro	Ala	Lys	Tyr	Asp	Ser	Val	Ile	Ala	Val	165	170	175	
Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Asn	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	180	185	190	
Ala	Glu	Leu	Glu	Val	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Tyr	Ser	Thr	Tyr	195	200	205	
Pro	Thr	Ser	Thr	Tyr	Ala	Thr	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	210	215	220	
His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Leu	225	230	235	240

ES 2 618 846 T3

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
245 250 255

Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
260 265 270

Ala Gln

<210> 6
<211> 240
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> PrpsB

<400> 6

catatgccag gtcatagaat tatatgaaca gggatattcg gcaagtcaaa ttgcccagaa 60
aatgaagagc ggaaagacag aaatcgagct atttttaaaa ttctgctcca aaggtgtaaa 120
ggattcttga ttgtcggata aagctgtggt atattatgtc ttggtgttaa atacacacgc 180
ttaacgattt atgcagaggg tgctgcaggg ggcagttctg tacaaaaatg acctggatcc 240

<210> 7
<211> 156
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Fragmento de secuencia según la Figura 27 del documento

<400> 7

ctcgggaact ctttcctctg gaggtgaag cgggtctattc atactttcga actgaacatt 60
tttctaaaac agttattaat aaccaaaaaa ttttaaattg gtctctccaa aaaataggcc 120
taccatataa ttcatttttt ttctataata aattaa 156

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico no natural que comprende

- a) una primera secuencia promotora que comprende una secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la SEQ ID NO. 7 en al menos el 75 %,
- b) una segunda secuencia promotora que comprende una secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la SEQ ID NO. 6 en las posiciones 7 a 234 en al menos el 78,5 %,
- c) una secuencia de ácido nucleico, que codifica para un polipéptido,

caracterizado porque en la molécula de ácido nucleico, en orientación 5'→3', la segunda secuencia promotora se encuentra delante de la primera secuencia promotora.

2. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la primera secuencia promotora y la segunda secuencia promotora están funcionalmente acopladas de tal manera que provocan una expresión aumentada de la secuencia de ácido nucleico c) en una célula huésped en comparación con una célula huésped en la que tiene lugar la expresión de la secuencia de ácido nucleico c) con solo una de las secuencias promotoras a) o b).

3. Ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la primera secuencia promotora está presente de modo natural en *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans* o *Bacillus pumilus* y/o la segunda secuencia promotora está presente de modo natural en *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans* o *Bacillus pumilus*.

4. Ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la secuencia de ácido nucleico c) codifica para una enzima, en particular para una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, β -glucosidasa, carragenasa, oxidasa, oxidorreductasa o lipasa.

5. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.

6. Célula huésped no humana que contiene un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** es una bacteria, preferentemente una que se selecciona del grupo de los géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, más preferentemente una que se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

8. Célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** tiene un núcleo celular.

9. Procedimiento para la preparación de un polipéptido que comprende

- a) cultivar una célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8,
- b) aislar el polipéptido del medio de cultivo o de la célula huésped.

10. Uso de una célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8 para la preparación de un polipéptido.

11. Uso de un vector de acuerdo con la reivindicación 5 para la preparación de un polipéptido.

12. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un polipéptido.

Figura 1

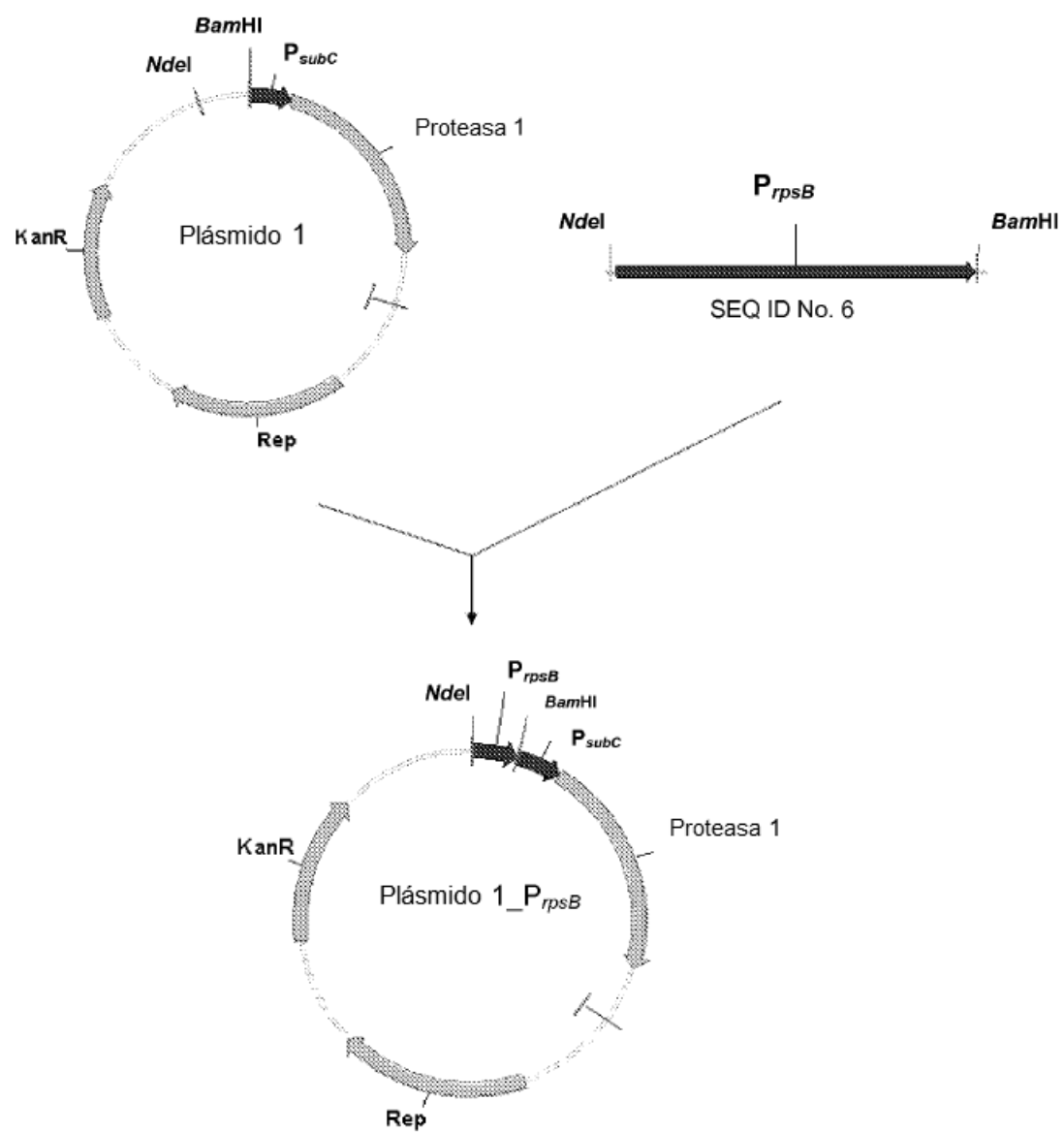


Figura 2

