

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 910**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 14151250 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2722390**

54 Título: **Regulación de promotores inducibles**

30 Prioridad:

29.07.2010 EP 10171252

14.04.2011 EP 11162420

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

10.10.2017

73 Titular/es:

LONZA LTD (100.0%)

Lonzastrasse

3930 Visp, CH

72 Inventor/es:

WENZEL, MARIAN;

ALTENBUCHNER, JOSEF y

KIZIAK, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 636 910 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

Regulación de promotores inducibles

La presente invención se refiere a la producción de polipéptidos heterólogos en una célula hospedante bacteriana recombinante. En particular, la presente invención se refiere a la regulación de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el polipéptido mediante el uso de un promotor inducible por un sustrato específico (inductor). Más en concreto, la presente invención se refiere a la regulación de la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula hospedante bacteriana, en la que se provoca que la célula hospedante bacteriana sea incapaz de desactivar el promotor que controla la expresión del polipéptido heterólogo en ausencia del inductor.

10 **Antecedentes de la invención**

Un aspecto importante en la producción de polipéptidos heterólogos en un microorganismo recombinante es la selección del promotor utilizado para controlar la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que codifican el polipéptido diana.

15 Un promotor adecuado debe ser fuerte, es decir, debe producir el respectivo ARNm a una tasa elevada, lo cual permite la producción del polipéptido en elevadas cantidades. Además, el promotor debe ser fácil de regular y debe comenzar la producción del polipéptido heterólogo solo tras la inducción.

20 Sin embargo, existe el problema de que, generalmente, el sustrato inductor es un nutriente para el microorganismo y es consumido por el microorganismo. Así, cuando en el medio utilizado para cultivar el microorganismo se acaba el sustrato inductor, el microorganismo desactiva el promotor y, por tanto, se detiene la expresión del polipéptido diana. Para evitar la detención no deseada de la expresión génica, el inductor debe añadirse en grandes cantidades y/o suplementarse de modo continuo. La necesidad de elevadas cantidades de inductor aumenta los costes del proceso de fermentación. Además, el uso de promotores eficaces que, sin embargo, requieren inductores caros es limitado.

25 Por consiguiente, para la producción de polipéptidos recombinantes se desean células hospedantes en las que la actividad del promotor que controla la expresión del polipéptido heterólogo sea independiente de la presencia del inductor, pero en las que la expresión del polipéptido heterólogo pueda, no obstante, ser estrictamente regulada.

30 El documento WO 2006/133210 A2 se refiere a un método para producir péptidos recombinantes en una célula hospedante bacteriana que utiliza un promotor inducible por manitol, arabitol, glucitol o glicerol, en el que se ha provocado que la célula hospedante bacteriana sea incapaz de degradar o metabolizar el inductor. Según dicho método, uno o más genes que codifican enzimas necesarias para metabolizar el inductor se delecionan o alteran genéticamente en el genoma de modo que la célula no pueda expresar, a partir de su genoma, una enzima funcional necesaria para metabolizar o degradar el inductor. Para asegurar la captación del inductor, los genes relacionados con el transporte del inductor hacia el interior de la célula no se modifican. Sin embargo, este método requiere no obstante la adición del inductor para catalizar la activación del respectivo promotor que controla la expresión del polipéptido diana. Además, la acumulación del inductor en la célula puede afectar negativamente al desarrollo de la célula.

35 Muchas bacterias son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono. Si se les proporciona una mezcla de fuentes de carbono, seleccionarán la fuente de carbono que permita el crecimiento más rápido (fuente de carbono primaria). De modo simultáneo, las funciones implicadas en la utilización de las fuentes de carbono secundarias son reprimidas por un fenómeno denominado represión por catabolitos de carbono ("carbon catabolite repression", CCR).

40 Además de la CCR, los genes catabólicos específicos implicados en la utilización de una fuente de carbono secundaria menos preferida solo son expresados en presencia de dicha fuente de carbono secundaria. Por consiguiente, la expresión de genes implicados en el catabolismo de una fuente de carbono secundaria depende de la presencia de dicha fuente de carbono secundaria (inducción) y de la ausencia de una fuente de carbono primaria (represión por catabolitos).

45 La publicación de Tianqui Sun *et al.*, "Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*", Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology, vol. 192, n.º 8, 1 de abril, 2010, pp. 2128 bis 2139, se refiere a la identificación del operón de manosa y sus genes, así como de los promotores *PmanP* y *PmanR* regulados por manosa. Se indica que el metabolismo de la manosa está sujeto al sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa y que el operón de manosa también está sujeto a la represión por catabolitos de carbono. Para la caracterización y la identificación de la función de los genes individuales, se prepararon mutantes inactivados ("knockout") que carecían de los respectivos genes y, por consiguiente, carecían de las respectivas proteínas codificadas por dichos genes. Se descubrió que la delección del gen del transportador de manosa *manP* daba como resultado la expresión constitutiva de ambos promotores *PmanP* y *PmanR*, lo cual indica que el transportador de manosa ManP tiene un efecto negativo sobre la regulación del operón de manosa y del gen *manR* que codifica el regulador transcripcional específico de manosa ManR.

Tobisch *et al.*, "Regulation of the lic operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LiR regulator protein by site-directed mutagenesis" en Journal of Bacteriology, vol. 181, n.º 16, 19 de agosto, 1999, pp. 4995-5003 indican que el intercambio del aminoácido de unión al grupo fosforilo en el dominio EIIA del regulador LicR por otro aminoácido provoca la actividad del regulador mutante LicR en ausencia del sustrato inductor.

Görke *et al.*, "Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients" en Nature Reviews, Microbiology, vol. 6, n.º 8, agosto 2008, pp. 613-624 se refiere a cepas mutantes de *Streptococcus* deficientes en el transportador de manosa EIIAB y la influencia del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa. Se demuestra que el transportador de manosa EIIAB no se limita solo a la fosforilación de la manosa, sino que, de modo similar, fosforila la glucosa, la fructosa y la 2-desoxiglucosa. Además, se demuestra que, incluso en ausencia del transportador de manosa EIIAB, la manosa puede ser captada a través del transportador específico de fructosa EII^{FRU}.

Deutscher *et al.*, "The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria" (Current Opinion in Microbiology, Current Biology LTD, GB, vol. 11, n.º 2, 1 de abril, 2008, pp. 87-93) ofrecen una visión de conjunto del mecanismo de la represión por catabolitos de carbono en diferentes bacterias, por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*.

Sumario de la invención

La presente invención emplea estos mecanismos de regulación del catabolismo del carbono proporcionando una célula hospedante bacteriana en la que el promotor que regula la expresión de los genes implicados en el metabolismo de una fuente de carbono secundaria no se desactivan en ausencia de su correspondiente fuente de carbono, y en la que el promotor únicamente está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono.

Según la presente invención, el promotor utilizado es un promotor que regula la utilización de una fuente de carbono secundaria de la célula hospedante bacteriana.

En presencia, de una fuente de carbono primaria, el promotor es reprimido por la CCR. Cuando en el medio empleado para cultivar la célula hospedante bacteriana recombinante se acaba la fuente de carbono primaria o la concentración de la fuente de carbono primaria disminuye por debajo de un nivel requerido para la CCR, la CCR del promotor se convierte en inoperante y el promotor automáticamente inicia la expresión de los genes controlados por dicho promotor.

La presente invención proporciona una célula hospedante bacteriana recombinante, en la que la célula hospedante bacteriana recombinante es capaz de utilizar más de una fuente de carbono, en la que el catabolismo del carbono de estas fuentes de carbono de la célula hospedante bacteriana está sometido al sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa (PTS) y a la CCR, en la que la célula hospedante bacteriana está alterada genéticamente para evitar la desactivación de la proteína reguladora transcripcional de un promotor inducible por una fuente de carbono en ausencia de dicha fuente de carbono secundaria, pero está bajo el control de la CCR, en la que la fuente de carbono es una fuente de carbono secundaria para la célula hospedante bacteriana, y en la que la célula hospedante bacteriana recombinante de la presente invención se transforma con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria, en la que el promotor del vector está controlado por la proteína reguladora transcripcional por la cual la célula hospedante bacteriana ha sido genéticamente alterada para que sea incapaz de la desactivación en ausencia de la correspondiente fuente de carbono específica.

Además, la presente invención proporciona un proceso para preparar polipéptidos heterólogos mediante el cultivo de la célula hospedante bacteriana recombinante de la presente invención, transformada con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

Además, la presente invención se refiere al uso de una célula hospedante bacteriana recombinante según la presente invención en la producción de polipéptidos heterólogos.

Según un aspecto concreto, la presente invención se refiere a un régimen de inducción de la expresión génica que requiere una cantidad reducida de inductor y, en particular, no requiere inductor. Según otro aspecto concreto, la presente invención se refiere a un sistema de expresión bacteriana adecuado para la fermentación de alta densidad celular.

En particular, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido heterólogo en una célula hospedante bacteriana recombinante, en el que se emplea una célula hospedante bacteriana recombinante cuyo catabolismo de las fuentes de carbono está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono y del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa, y que está genéticamente alterada de modo que es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional específica para un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria en ausencia de la fuente de carbono secundaria inductora, y que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor, que es inducible por la fuente de carbono secundaria y está regulado por la proteína reguladora transcripcional, y dicho método comprende las etapas de cultivar la célula hospedante bacteriana en un medio de cultivo celular que no

comprende la fuente de carbono secundaria inductora sino una fuente de carbono primaria, inducir la expresión de dicho polipéptido por la fuente de carbono primaria en un momento en que la concentración de la fuente de carbono diferente disminuye por debajo de un nivel necesario para la represión por catabolitos de carbono, en el que la fuente de carbono primaria se añade al cultivo en una cantidad suficiente para mantener una velocidad de crecimiento predeterminada de la célula hospedante bacteriana sin inducción de la represión por catabolitos de carbono, y recuperar el polipéptido de las células o del cultivo celular.

Además, la presente invención proporciona células hospedantes bacterianas recombinantes adecuadas para realizar el método de la presente invención.

Por ejemplo, la presente invención se refiere a una célula hospedante bacteriana recombinante cuyo catabolismo de las fuentes de carbono está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono y del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa, y que está alterada genéticamente de modo que es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional específica para un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria en ausencia de la fuente de carbono secundaria inductora mediante la delección, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, del gen que codifica una enzima de transferencia del grupo fosforilo EII específica para la proteína reguladora transcripcional, y que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor, que está regulado por la proteína reguladora transcripcional por la cual la célula hospedante bacteriana ha sido genéticamente alterada para que sea incapaz de la desactivación, y en la que en el vector se integra el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional específica. Además, la presente invención se refiere a una célula hospedante bacteriana recombinante cuyo catabolismo de las fuentes de carbono está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono y del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa, y que está alterada genéticamente de modo que es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional específica para un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria en ausencia de la fuente de carbono secundaria inductora alterando genéticamente, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional, de modo que la proteína reguladora transcripcional expresada por dicho gen es incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido por la enzima EII, que es específica para dicha proteína reguladora transcripcional, y que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor regulado por la proteína reguladora transcripcional por la cual la célula hospedante bacteriana ha sido genéticamente alterada para que sea incapaz de la desactivación, y en la que en el vector se integra además el gen manipulado que codifica la proteína reguladora transcripcional incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido por la correspondiente enzima EII.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica tras estudiar la siguiente descripción detallada y remitiéndose a las figuras ilustrativas acompañantes y a las reivindicaciones adjuntas.

Según la realización indicada anteriormente, la inducción de la expresión de un polipéptido diana es independiente de la presencia de una fuente de carbono inductora para el promotor. Así, esta realización es particularmente ventajosa porque no es necesaria una fuente de carbono inductora.

Breve descripción de las figuras

En las figuras:

la **figura 1** muestra esquemáticamente la estructura del operón de manosa con la disposición y la orientación de los respectivos genes, y los promotores y su activación por ManR se indican con flechas;

la **figura 2** es un diagrama de flujo del catabolismo de la manosa con el transporte hacia el interior de la célula, la fosforilación de la manosa a manosa-6-fosfato durante el transporte y la conversión a fructosa-6-fosfato;

la **figura 3** muestra esquemáticamente la estructura de la proteína activadora ManR con los diversos dominios y sitios de fosforilación potenciales;

la **figura 4** es la secuencia de ácido nucleico de la región del promotor de *B. subtilis* que comprende el promotor *manR*;

la **figura 5** es la secuencia de ácido nucleico de *B. subtilis* empleada en el vector de promotor-sonda pSUN272.1 para estudiar la inducibilidad y la represión por catabolitos del promotor *manP* por la manosa y la glucosa y la determinación del sitio de unión de ManR;

la **figura 6** es el mecanismo de la represión por catabolitos y la activación en *B. subtilis* a través de CcpA;

la **figura 7** es el mapa de plásmido del vector de expresión pSUN279.2;

la **figura 8** muestra las actividades de β -galactosidasa de *B. subtilis* 3NA que contiene los plásmidos pSUN279.2, pSUN284.1 y pSUN291, respectivamente;

la **figura 9** muestra las actividades de β -galactosidasa de *B. subtilis* 3NA que contiene el plásmido pSUN 284.1, así

como otros plásmidos que contienen fragmentos de diferente longitud de la secuencia de ácido nucleico que aparece en la figura 5;

la figura 10 muestra las actividades de β -galactosidasa de *B. subtilis* 3NA que comprende los vectores pSUN291, pSUN385.2 y pSUN386.9 con las secuencias de ácidos nucleicos que aparecen en la figura 4;

5 la figura 11 es el mapa de plásmido del vector de expresión pMW168.1;

la figura 12 es el mapa de plásmido del vector de inserción pSUN356.7 ($\Delta manP$);

la figura 13 es un diagrama que muestra logarítmicamente la concentración de biomasa seca representada gráficamente a lo largo del periodo del proceso de fermentación de *B. subtilis* TQ356/pMW168.1 ($\Delta manP$ -mutante) y la señal de fluorescencia (RFU) representada gráficamente a lo largo del periodo del proceso;

10 la figura 14 es una SDS-PAGE de muestras de células tomadas de la fermentación con *B. subtilis* TQ356/pMW168.1, y

la figura 15 es un diagrama de flujo con la preparación del plásmido pMW168.1.

Descripción detallada de la invención

15 Tal como se emplean en la presente, se suministran las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la presente invención.

"Enzima EII", "EII" o "transportador" se refieren a una permeasa específica de fuente de carbono del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa (PTS), que cataliza el transporte y la fosforilación concomitante de la fuente de carbono.

El PTS comprende una diversidad de EII, cada una específica para una fuente de carbono, por ejemplo, un azúcar.

20 Las EII son complejos que habitualmente consisten en tres dominios A, B y C, y a veces un cuarto dominio D, en las que EIIA y EIIB participan en la fosforilación de la correspondiente fuente de carbono, y la EIIC unida a la membrana (EIID, si está presente) media en el paso de la fuente de carbono específica hacia el interior de la célula.

25 En ausencia de la fuente de carbono específica, la correspondiente EIIA y, en algunos casos, EIIB, desactiva la respectiva proteína reguladora transcripcional específica de fuente de carbono mediante la transferencia de grupos fosforilo a los correspondientes sitios de fosforilación presentes en la proteína reguladora transcripcional, denominados (dependiendo de la EII fosforilante) dominios EIIA y EIIB, respectivamente.

30 La "proteína reguladora transcripcional" o "regulador" regula positivamente (es decir, activa) el operón u operones catabólicos de la fuente de carbono específica. Las proteínas reguladoras transcripcionales habitualmente contienen dos dominios reguladores conservados que pueden ser fosforilados (dominios reguladores del PTS, PRD). Además, algunas proteínas reguladoras transcripcionales contienen además otros sitios de fosforilación relacionados con EIIA y EIIB. Dependiendo de la proteína reguladora transcripcional, esta es desactivada por la transferencia del grupo fosforilo desde la enzima II a uno o más de los anteriores sitios de unión a fosforilo en el dominio EIIA y EIIB y/o PRDI, y es activada por la transferencia del grupo fosforilo desde la proteína histidina (HPr) al dominio PRDII. Las diversas proteínas reguladoras transcripcionales específicas de fuente de carbono del PTS pueden ser activadores o antiterminadores.

35 Un "promotor", tal como se emplea en la presente, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión. Una "región de promotor" es una región reguladora capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora cadena abajo (dirección 3'). Dentro de la región de promotor se encuentran dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) que son responsables de la unión de una ARN polimerasa, tal como la caja -35 y la caja -10 (caja de Pribnow). Además, la región de promotor puede comprender el sitio de inicio de la transcripción y sitios de unión para su proteína reguladora transcripcional específica.

40 Los "variantes" o "variantes de una secuencia" son una secuencia de ácido nucleico que es distinta de la secuencia de referencia por sustituciones de ácidos nucleicos conservativas, en las que uno o más ácidos nucleicos son sustituidos por otros con las mismas características. Los variantes incluyen también las secuencias degeneradas, las secuencias con deleciones e inserciones, con la condición de que dichas secuencias modificadas muestren la misma función (son funcionalmente equivalentes) que la secuencia de referencia.

45 Un "vector que puede expresarse en un hospedante" o "vector de expresión" es una construcción de poli(ácido nucleico) generada por medios recombinantes o sintéticos, con una serie de elementos de poli(ácido nucleico) especificados que permiten la transcripción de una secuencia de ácido nucleico concreta en una célula hospedante. Generalmente, este vector incluye una unidad transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico concreta que va a ser transcrita unida operablemente a un promotor. Un vector que puede expresarse en un hospedante puede ser, por ejemplo, un plásmido de replicación autónoma o autorreplicante, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus.

Los términos y la expresión "transformación", "transformado" o "introducir un ácido nucleico en una célula hospedante" indican cualquier proceso en el que un ácido nucleico extracelular, tal como un vector, entra en una célula hospedante con o sin material acompañante.

5 La transformación de las células hospedantes apropiadas, por ejemplo, con un vector de expresión, puede lograrse por medio de métodos muy conocidos, tales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas o por medio de métodos químicos, tales como la transformación mediada por fosfato de calcio y por medio de sistemas de transformación naturales descritos, por ejemplo, en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) o en Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons (1984).

10 Una "secuencia de ácido nucleico heteróloga" o una "secuencia de ácido nucleico heteróloga para una hospedante" significa una secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un producto de expresión, tal como un polipéptido, que es extraño a la "expresión heteróloga" o al "producto heterólogo" del hospedante, es decir, una secuencia de ácido nucleico que procede de un donante diferente del hospedante, o una secuencia de ácido nucleico sintetizada de modo químico que codifica, por ejemplo, un producto de expresión, tal como un polipéptido,
15 que es extraño al hospedante. En el caso en que el hospedante sea una especie procariota concreta, la secuencia de ácido nucleico heteróloga procede preferiblemente de un género o familia diferente, más preferiblemente de un orden o clase diferente, en particular de un filo (división) diferente, aún más concretamente de un dominio (imperio) diferente de organismos.

20 La secuencia de ácido nucleico heteróloga que procede un donante distinto al hospedante puede modificarse antes de ser introducida en la célula hospedante mediante mutaciones, inserciones, deleciones o sustituciones de ácidos nucleicos individuales o de una parte de la secuencia de ácido nucleico heteróloga, con la condición de que dichas secuencias modificadas muestren la misma función (sean funcionalmente equivalentes) que una secuencia de referencia. Una secuencia de ácido nucleico heteróloga, tal como se indica en la presente, incluye también secuencias nucleicas procedentes de un dominio (imperio) diferente de organismos, tales como de eucariotas (de
25 origen eucariota), tales como, por ejemplo, anticuerpos humanos que se han empleado en bancos de presentación de fagos y en los cuales ácidos nucleicos individuales o una parte de las secuencias de los ácidos nucleicos han sido modificados según la "utilización de codones" de un hospedante procariota.

Un "polipéptido heterólogo" o "polipéptido diana", dentro del significado de la presente invención, puede ser una proteína heteróloga de origen humano, de mamífero o procariota. Otras proteínas son antígenos, tales como
30 glicoproteínas y carbohidratos, procedentes de patógenos microbianos, tanto víricos como antibacterianos, y procedentes de tumores. Otros polipéptidos heterólogos son enzimas, tales como quimosina, proteasas, polimerasas, deshidrogenasas, nucleasas, glucanasas, oxidasas, alfa-amilasa, oxidorreductasas, lipasas, amidasas, nitrilo hidratasas, esterases o nitrilasas.

Una "fuente de carbono" se refiere a una fuente de carbono, generalmente un carbohidrato, que puede ser captada y
35 metabolizada por una célula bacteriana y está sometida a PTS y a la represión por catabolitos de carbono (CCR), cuyos ejemplos típicos para los carbohidratos son los azúcares y los derivados de azúcares.

Muchas bacterias pueden utilizar más de un carbohidrato como fuente de carbono y energía. Empleando enzimas extracelulares específicas, las bacterias, tales como Bacilli, son capaces de degradar varios polisacáridos que están
40 presentes en grandes cantidades en la biomasa vegetal. Los oligo-, di-, o monosacáridos resultantes son transportados al interior de la célula y son procesados aún más. Habitualmente, las enzimas catabólicas implicadas en el metabolismo o la degradación de los sacáridos son sintetizadas solo cuando el sustrato específico está presente en el medio de cultivo y las fuentes de carbono y energía preferidas están ausentes. Una vía de transporte de carbohidratos preferida para transportar carbohidratos a través de la membrana de la célula o bacteria es el PTS.

En el PTS, el transporte del carbohidrato a través de la membrana y la posterior fosforilación están mediados por
45 una enzima específica para dicho carbohidrato, denominada enzima II (EII). Puesto que EII media en el transporte de su correspondiente fuente de carbono hacia el interior de la célula, la EII también se denomina "transportador".

En presencia de una mezcla de carbohidratos, las células captan selectivamente la fuente de carbono que les proporciona la mayor energía y ventaja de crecimiento (fuente de carbono primaria). De modo simultáneo, reprimen las diversas funciones implicadas en el catabolismo y captación de las fuentes de carbono menos preferidas (fuente
50 de carbono secundaria).

Generalmente, una fuente de carbono primaria para la mayoría de las bacterias es la glucosa y, dependiendo de la bacteria, se han empleado diversos otros azúcares y derivados de azúcares como fuentes de carbono secundarias. Sin embargo, una fuente de carbono primaria también puede ser otro compuesto, por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas*, una fuente de carbono primaria puede ser un compuesto aromático.

55 Las fuentes de carbono secundarias incluyen, por ejemplo, manosa, lactosa y melibiosa, sin que limiten a estas.

En el PTS, los diversos genes catabólicos implicados en el metabolismo de una fuente de carbono específica son controlados por proteínas reguladoras transcripcionales. Estas proteínas reguladoras transcripcionales pueden

actuar como antiterminadores o activadores transcripcionales y solo son activas en presencia de una fuente de carbono específica (inductor). Se ha descubierto que EII tiene un efecto de regulación negativo (desactivante) hacia su correspondiente proteína reguladora transcripcional por medio de la transferencia de grupos fosforilo a un sitio de unión específico presente en la proteína reguladora transcripcional.

5 En ausencia de una fuente de carbono primaria y en presencia de la fuente de carbono inductora específica de promotor, el promotor es activado por su correspondiente proteína reguladora transcripcional, y los genes bajo el control de este promotor son expresados. En ausencia de la fuente de carbono inductora, la proteína reguladora transcripcional que regula el promotor es desactivada por la transferencia del grupo fosforilo desde su EII al respectivo sitio de unión sobre la proteína reguladora transcripcional, desactivando con ello el promotor y deteniendo la expresión de los genes bajo el control de dicho promotor.

10 En otras circunstancias, en presencia de una fuente de carbono primaria preferida (independientemente de que estén o no presentes fuentes de carbono secundarias menos preferidas), la expresión de los genes catabólicos de dichas fuentes de carbono secundarias es reprimida por la CCR.

15 En general, la presente invención se basa en la inhibición de la regulación de la proteína reguladora transcripcional específica de fuente de carbono en ausencia de dicha fuente de carbono específica. En particular, la presente invención se basa en evitar la represión o la desactivación por la transferencia de un grupo fosforilo a través de la correspondiente EII a la proteína reguladora transcripcional.

20 Si se evita la represión de una proteína reguladora transcripcional específica de una fuente de carbono, un promotor para el cual dicha proteína reguladora transcripcional es un activador está activo, independientemente de la presencia de una fuente de carbono que sea un inductor para dicho promotor. Por consiguiente, no es necesaria una fuente de carbono inductora para la expresión de un gen bajo el control de dicho promotor y, además, el gen se expresa de modo continuo.

A la vista de lo anterior, la presente invención emplea un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria, en el que el promotor es controlado por el PTS por un lado, y por la CCR por el otro.

25 Por consiguiente, la presente invención busca prevenir la desactivación de un promotor inducible por una fuente de carbono empleado como promotor en la expresión de un polipéptido diana evitando la desactivación de la proteína reguladora transcripcional específica para dicho promotor.

30 Según una primera estrategia, este objetivo se consigue interrumpiendo la fosforilación de la proteína reguladora transcripcional por su EII específica, haciendo que al menos un sitio de unión de la proteína reguladora transcripcional para el grupo fosforilo transferido por EII sea incapaz de unirse al grupo fosforilo.

Para lograr esto, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional puede manipularse genéticamente para que el gen exprese una proteína reguladora transcripcional que sea incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido desde EII.

35 Según una segunda estrategia, la fosforilación se interrumpe delecionando, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen que codifica EII, es decir, la enzima que regula la actividad de la proteína reguladora transcripcional.

40 Según la presente invención, la expresión de un polipéptido heterólogo se coloca bajo el control de un promotor que es específico para la proteína reguladora transcripcional indicada anteriormente, para la cual se evita la desactivación por la transferencia del grupo fosforilo realizada por EII por medio de la alteración genética de la célula hospedante bacteriana.

45 La presente invención proporciona un sistema ventajoso para producir polipéptidos heterólogos mediante la fermentación de la célula hospedante bacteriana recombinante de la presente invención, transformada con un vector que comprende el ácido nucleico heterólogo que codifica dicho polipéptido unido operablemente a un promotor inducible por una fuente de carbono, en el que el promotor es activo incluso cuando no está presente la fuente de carbono inductora en el medio de fermentación. Puesto que el promotor que controla la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido diana aún se encuentra bajo el control de la represión por catabolitos de carbono, no se produce expresión en presencia de una fuente de carbono primaria, tal como glucosa, sino que la inducción se logra automáticamente cuando en el sistema se acaba la fuente de carbono primaria (autoinducción). Puesto que la actividad del promotor que controla la expresión del polipéptido heterólogo es independiente de la presencia de una fuente de carbono inductora, en el medio de fermentación se logra la inducción de la expresión del polipéptido diana sin que sea necesaria una fuente de carbono inductora.

50 La presente invención resulta ventajosa porque las células hospedantes bacterianas recombinantes pueden cultivarse hasta una alta densidad celular en presencia de su fuente de carbono primaria y, en cuando se alcanza la densidad celular deseada, la producción del polipéptido diana comienza automáticamente tras liberarse la represión por catabolitos de carbono del promotor que controla la expresión.

Otra ventaja de la presente invención es que, en una fermentación de alimentación discontinua, durante la fase discontinua no se produce o casi no se produce el polipéptido diana, es decir, existe una fuerte represión por catabolitos.

5 Las células hospedantes bacterianas adecuadas para la presente invención son aquellas que pueden utilizar más de una fuente de carbono, en las que la utilización de las diferentes fuentes de carbono está sometida a la represión por catabolitos de carbono y en las que el transporte de la fuente de carbono a través de la membrana y su fosforilación están sometidos al sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa.

10 Las células hospedantes bacterianas adecuadas para la presente invención pueden ser bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Los ejemplos preferidos son las que pertenecen al filo Firmicutes, y, en particular, las que pertenecen a la clase Bacilli. Los ejemplos específicos son las del género *Bacillus*, tales como *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. licheniformis*, *B. natto*, *B. megaterium*, etc., y otros ejemplos preferidos incluyen, concretamente, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* u otros miembros de las enterobacterias, sin que limiten a estas.

15 Generalmente, las Firmicutes son Gram-positivas y tienen un bajo contenido en GC. Un "bajo contenido en GC" significa que menos del 52% de las pares de bases en el genoma bacteriano son pares GC. Por ejemplo, las bacterias Gram-positivas, tales como *Bacillus* y *Clostridium*, contienen 40% o menos pares GC en el genoma.

20 Otras células hospedantes bacterianas adecuadas son las bacterias entéricas, tales como las que pertenecen al orden Enterobacteriales. Los ejemplos de dichas bacterias entéricas son aquellas que son Gram-negativas, tales como las que pertenecen al género *Escherichia*. Los ejemplos específicos son cepas de *E. coli*, tales como TG1, W3110, DH1, XL1-Blue y Origami.

E. coli y las bacterias entéricas contienen aproximadamente 50% de contenido en GC en el genoma y, por tanto, son organismos con un bajo contenido en GC.

25 Los organismos Gram-positivos y Gram-negativos se determinan según el procedimiento de tinción Gram muy conocido. Los organismos Gram-positivos son los que adoptan un color violeta con la tinción Gram convencional. Los organismos Gram-negativos incorporan el contratinte y no el tinte Gram primario.

30 Existen diferentes mecanismos de CCR en Firmicutes y en bacterias entéricas que se han estudiado a fondo en *Bacillus subtilis* y *E. coli* como organismo modelo (se remite, por ejemplo, a J. Stülke *et al.*, "Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species", *Annu. Rev. Microbiol.*, (2000), 54:849-880; Görke B. y Stülke J., "Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients", *Nat. Rev. Microbiol.*, (2008), 6:613-624; Gosset G. *et al.*, Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* (2004), 186:3516-3524, Martínez-Antonio A. *et al.*, Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.*, (2003), 6:482-489). Aunque el mecanismo global de la CCR es diferente, el resultado es el mismo, es decir, que en presencia de una fuente de carbono primaria, los diversos operones catabólicos implicados en la captación y la fosforilación de las fuentes de carbono secundarias son reprimidos.

35 La célula hospedante bacteriana recombinante de la presente invención se altera genéticamente para evitar la represión de un promotor inducible por una fuente de carbono que controla la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga mediante la inhibición de la desactivación de la proteína reguladora transcripcional específica de promotor en ausencia de dicha fuente de carbono inductora.

40 Así, en la célula hospedante bacteriana recombinante de la presente invención, el promotor inducible por una fuente de carbono que controla la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga se somete solo a la represión por catabolitos de carbono. En presencia de una fuente de carbono primaria, la expresión del polipéptido heterólogo es reprimida por la CCR.

45 Según la presente invención, el promotor inducible por una fuente de carbono está en su estado activo independientemente de la presencia de la fuente de carbono inductora, a menos que la represión por catabolitos de carbono sea estimulada por una fuente de carbono primaria más preferida.

Por tanto, la presente invención proporciona la producción de polipéptidos heterólogos sin que sea necesario un inductor para inducir al promotor que controla el gen o genes que codifican el polipéptido.

50 En general, los promotores adecuados para la presente invención son los promotores que están sujetos a PTS y CCR en células bacterianas. En particular, las respectivas proteínas reguladoras transcripcionales son activadores o antiterminadores para el operón catabólico bajo el control de dichos promotores. Estos promotores son conocidos en la técnica. Los ejemplos de promotores adecuados para la presente invención se indican en la siguiente tabla con referencia al respectivo operón:

Operón	Regulador a)	Tipo b)	Inductor	Organismo
<i>sacPA</i>	SacT	AT	sacarosa	<i>B. subtilis</i>

<i>sacB</i>	SacY	AT	sacarosa	<i>B. subtilis</i>
<i>bgl PH</i>	LicT	AT	β -glucósidos	<i>B. subtilis</i>
<i>licBCAH</i>	LicR	A	oligo- β -glucósidos	<i>B. subtilis</i>
<i>levDEFG sacL</i>	LevR	A	fructosa	<i>B. subtilis</i>
<i>mtlAD</i>	MtlR	A	manitol	<i>B. subtilis</i>
<i>manPA-yjdB</i>	ManR	A	manosa	<i>B. subtilis</i>
<i>manR</i>	ManR	A	manosa	<i>B. subtilis</i>
<i>bglFB bglG</i>	BglG	AT	β -glucósidos	<i>E. coli</i>
<i>lacTEGF</i>	LacT	AT	lactosa	<i>L. casei</i>
a: proteína reguladora transcripcional b: A: activador AT: antiterminador				

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia al operón de manosa de *B. subtilis*. *B. subtilis* puede utilizar una pluralidad de diferentes mono- o disacáridos como fuente de carbono, tales como glucosa, maltosa, sacarosa, manosa, manitol, y fructosa. Estos sacáridos son captados por el sistema PTS. El transporte al interior de la célula y la fosforilación están mediados por la enzima EII específica para el respectivo sacárido.

Como en muchas bacterias, la fuente de carbono preferida de *B. subtilis* es la glucosa. En presencia de glucosa, la captación de cualquier otro sacárido sujeto al PTS es reprimida por la CCR.

La estructura del operón de manosa se muestra en la figura 1, y el transporte de manosa hacia el interior de la célula y su catabolismo se muestra en la figura 2. El operón de manosa de *B. subtilis* comprende tres genes catabólicos (Kunst F. N. *et al.*, "The complete genome sequence of gram-positive bacterium *B. subtilis*", Nature (1997), 390:249-256).

El primer gen, *manP*, codifica la enzima EII específica de manosa, denominada ManP. La ManP lleva a cabo el transporte de manosa a través de la membrana y, simultáneamente, la fosforilación de la manosa a manosa-6-fosfato. El segundo gen, *manA*, codifica una manosa-6-fosfato isomerasa que convierte la manosa-6-fosfato en la correspondiente fructosa-6-fosfato. La función del tercer gen, *yjdB*, aún es desconocida. Cadena arriba y en la misma orientación de estos tres genes, está colocado un gen regulador, *manR*, que codifica la proteína reguladora transcripcional denominada ManR.

El operón de manosa es un operón catabólico regulado positivamente y está controlado por dos promotores diferentes. Un promotor, el promotor *manR* (*PmanR*), es responsable de la proteína reguladora transcripcional ManR. El segundo promotor, el promotor *manP* (*PmanP*), es responsable de la transcripción de los genes *manP-manA-yjdB* (denominados conjuntamente "*manPA-yjdB*"). En presencia de manosa y en ausencia de glucosa, ManR se une a *PmanP* y activa la expresión de *manPA-yjdB*. De modo sorprendente, se ha descubierto que ManR no solo es la única proteína reguladora transcripcional para el promotor de *manPA-yjdB*, sino que también es un autorregulador para la propia *manR*.

La figura 3 muestra de modo esquemático la estructura de la proteína reguladora transcripcional ManR y los sitios de fosforilación potenciales. Tal como se muestra, ManR comprende dos dominios PRD ("PTS regulatory domain", dominio regulador de PTS), un dominio EIIA y EIIB, así como un dominio HTH ("Helix-turn-Helix", hélice-vuelta-hélice). Los PRD son dominios reguladores conservados presentes en proteínas reguladoras transcripcionales que pueden ser fosforilados en el transcurso del catabolismo del carbono. Los dominios EIIA y EIIB son sitios de unión del grupo fosforilo transferido por ManP, el transportador EII del operón de manosa. HTH es un motivo estructural en una proteína capaz de unirse al ADN.

En ausencia del inductor manosa, el dominio EIIA y EIIB y, finalmente, el dominio PRDI de ManR son fosforilados por ManP, la EII específica de manosa del operón de manosa y, con ello, se inactivan.

Por consiguiente, según la primera estrategia de la presente invención, se evita la desactivación de ManR en ausencia del inductor manosa, si los sitios de fosforilación en EIIA y/o EIIB de ManR son manipulados o los dominios son deletados, de modo que no pueden aceptar un grupo fosforilo.

Para conseguir esto, el gen *manR* en el genoma de la célula hospedante bacteriana se altera genéticamente deletando o manipulando la correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica el respectivo o respectivos sitios de fosforilación en ManR.

Además, según la segunda estrategia de la presente invención, se evita la desactivación de los promotores del operón de manosa mediante la interrupción del transporte de manosa, lo cual puede llevarse a cabo mediante delección o inactivación del gen que codifica ManP en el genoma de la célula hospedante bacteriana.

5 Estas alteraciones pueden realizarse alterando o delecionando, en la célula hospedante bacteriana, la secuencia codificadora de los genes que codifican las proteínas implicadas en la fosforilación de la proteína reguladora transcripcional, en este caso, en el operón de manosa, *manR* y/o *manP*.

10 Estas células hospedantes inactivadas ("knock-out") genéticamente alteradas pueden prepararse según cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica para este fin. Por ejemplo, los vectores de recombinación homólogos que contienen secuencias génicas diana homólogas 5' y 3' de la secuencia de delección del ácido nucleico diana pueden transformarse en la célula hospedante. Tras la recombinación homóloga, puede producirse la célula inactivada deseada.

15 Los métodos de inactivación de genes son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inactivación de genes mediante la inserción de un polinucleótido se ha descrito, por ejemplo, en Röder D. L. *et al.*, "Marker-exchange mutagenesis of a pektate lyase isozyme gene in *Erwinia chrys anthemy*", J. Bacteriol. (1985), 164(1:51-56). Las mutaciones o delecciones específicas en un gen pueden construirse empleando mutagénesis de módulos, por ejemplo, como se describe en Wells J. A. *et al.*, "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites", Gene (1985), 34 (2-3):315-323, en la cual se realizan mutaciones directas o aleatorias en una porción seleccionada de un gen y después se incorporan en la copia cromosómica del gen mediante recombinación homóloga.

20 Los presentes inventores han descubierto que los promotores que regulan el operón de manosa, concretamente *PmanR* y *PmanPA-yjdF*, son promotores fuertes y, por tanto, son candidatos prometedores para la producción de polipéptido heterólogos. Sin embargo, la manosa, la fuente de carbono que induce a estos promotores, es un azúcar caro, lo cual, por ahora, limita el uso de los promotores inducibles por manosa.

25 Puesto que, según la presente invención, para la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula hospedante bacteriana no es necesaria una fuente de carbono inductora para iniciar la expresión, el uso de promotores, tales como los promotores de manos, además resulta más competitivo no solo a la vista de ser un promotor fuerte, sino también por los costes.

30 Por consiguiente, la presente invención se refiere también al uso de los promotores del operón de manosa, *PmanR* y *PmanPA-yjdF*, como promotores para controlar una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido diana en la célula hospedante bacteriana recombinante de la presente invención.

35 La secuencia de ácido nucleico procedente de *B. subtilis* que comprende la región de promotor del promotor *manP*, tal como se emplea en diversos vectores de expresión, tales como pSUN284.1, se muestra en la figura 5, destacándose el sitio de inicio de la transcripción en un nucleótido de adenina, y las cajas -35 y -10 en cursiva y negrita, y el final de *manR* está marcado con una flecha, y los sitios de restricción *BglII*, *XbaI*, *AflII*, *NdeI* y *NruI* están subrayados. Se indica el codón de inicio del gen indicador *lacZ*.

La secuencia de ácido nucleico obtenida de *B. subtilis* que comprende la región del promotor del promotor *manR* se muestra en la figura 4, destacándose el sitio de inicio de la transcripción, y las cajas -10 y -35 en cursiva y negrita, y el inicio del gen *manR* se indica con una flecha, y los sitios de restricción *HindIII* están en negrita y subrayados, y la secuencia *cre* putativa está subrayada.

40 Las "regiones de promotor del operón de manosa" significa las regiones de promotor que regulan la expresión de *manPA-yjdF*, así como de *manR*, con o sin la secuencia *cre*. El "promotor *manPA-yjdF*", tal como se denomina en la presente, consiste fundamentalmente en la región -35, la región -10 (caja de Pribnow), el sitio de inicio de la transcripción, y el sitio de unión a ManR.

45 El "promotor *manR*", tal como se denomina en la presente, consiste fundamentalmente en la región -35, la región -10, el sitio de inicio de la transcripción y el sitio de unión a ManR y, opcionalmente, una secuencia *cre*.

50 La secuencia *cre* ("catabolite repressive element", elemento represor de catabolitos) es una secuencia de ADN de 14 nucleótidos de longitud conservada a la cual se une CcpA ("catabolite control protein A", proteína A de control de catabolitos), la proteína reguladora global de la CCR en Firmicutes. El mecanismo de la represión por catabolitos y la activación en *B. subtilis* se muestra en la figura 6. Mediante la unión de la CcpA, complejada por la HPr fosforilada en la serina-46 (proteína de histidina) a la secuencia *cre*, el promotor es reprimido. Esto representa un segundo mecanismo de represión por catabolitos del operón de manosa. De esta forma, la expresión del gen regulador *manR* es reprimida en presencia de glucosa. En consecuencia, esto inhibe la activación del promotor *manP*. En presencia de glucosa, las células captan glucosa a través de PtsG, un sistema de transporte dependiente de PTS similar al transportador de manosa EII. En la célula, los intermedios fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) y fructosa-1,6-bifosfato (Fru-1,6-DP) se acumulan y estimulan a la HPr-quinasa. La HPr-quinasa (HPrK) fosforila la HPr en la serina-46. Ser-46-HPr forma un complejo con la proteína de unión a ADN CcpA, que se une a los denominados sitios *cre* presentes en muchos promotores reprimidos por catabolitos y activados por catabolitos de *B. subtilis*. Si el sitio *cre* está cadena

abajo de la secuencia de promotor -10 o se solapa con la secuencia -10, la unión del complejo Ser-46-HPr/CcpA inhibe la expresión desde este promotor. Esta situación se encuentra en el promotor *manR* (figura 4).

5 La secuencia de ácido nucleico que comprende la región de promotor de *manPA-yjdF* preferiblemente comprende la secuencia de ácido nucleico de la figura 5 desde pb-80 hasta el codón de inicio de *lacZ* (SEQ ID NO:1) y, más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico de la figura 5 desde pb-80 e incluyendo pb-1, es decir, cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción A en pb+1 (SEQ ID NO:2).

10 La secuencia de ácido nucleico que comprende la región de promotor de *manPA-yjdF* preferiblemente comprende la secuencia de ácido nucleico de la figura 4 desde pb-122 hasta el codón de inicio de *manR* (SEQ ID NO:3), más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico de la figura 4 desde pb-122 y pb+7, es decir, incluye la secuencia *cre* putativa (SEQ ID NO:4), y, en particular, la secuencia de ácido nucleico de la figura 4 desde pb-122 y pb-1, es decir, cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción G en pb+1 (SEQ ID NO:5). Ambas regiones de promotor de *manP* y *manR* comprenden un sitio de unión para la proteína reguladora transcripcional ManR (marcada en la figura 4 como IRI-R y en la figura 5 como IRI-P), que es el activador transcripcional para los promotores del operón de manosa.

15 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a dicha célula hospedante bacteriana genéticamente alterada que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés unida operablemente a un promotor inducible por una fuente de carbono, en la que el promotor del vector es regulado por la proteína reguladora transcripcional por la cual la célula hospedante bacteriana ha sido genéticamente alterada para que sea incapaz de la desactivación en ausencia de la fuente de carbono específica para dicha proteína reguladora transcripcional.

20 Con respecto al anterior operón de manosa, el promotor del vector puede ser *PmanR* o *PmanPA-yjdF*, por ejemplo, cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO:1 a 5, así como cualquiera de la anterior tabla.

25 Según una realización de la presente invención, en el vector utilizado en la presente invención, puede incorporarse un gen genéticamente alterado que codifica la respectiva proteína reguladora transcripcional incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido por la respectiva EII. Por consiguiente, en la célula hospedante bacteriana recombinante, la proteína reguladora transcripcional no solo es expresada por el gen cromosómico, sino también por el correspondiente gen integrado en el vector, lo cual produce una mayor concentración de la proteína reguladora transcripcional y una mejor inducción. Por ejemplo, cuando el promotor del vector es un promotor del operón de manosa, el gen *manR* puede integrarse en el vector, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio EIIA ha sido delecionada (*manRΔEIIA*).

30 Un vector adecuado para la presente invención es preferiblemente un plásmido de replicación autónoma o autorreplicante, un cósmido, un fago, un virus o un retrovirus. Puede emplear una amplia diversidad de combinaciones de hospedante/vector para la presente invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ácidos nucleicos cromosómicas, no cromosómicas y/o sintéticas.

35 Los vectores adecuados incluyen vectores con una gama de hospedantes específicos, tales como vectores específicos, por ejemplo, de *B. subtilis* y *E. coli*, respectivamente, así como vectores con una gama amplia de hospedantes, tales como vectores útiles para bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. Pueden emplearse plásmidos de "bajo número de copias", de "número de copias intermedio" y de "alto número de copias".

40 Por ejemplo, en *B. subtilis*, un plásmido de bajo número de copias es pAMBeta1, los plásmidos de número de copias intermedio son los derivados de pBS72, y un plásmido de alto número de copias es pUB110. Los vectores útiles, por ejemplo, para la expresión en *E. coli* son pBR322, pUC18, pACYC177, pACYC184, pRSF1010 y pBW22 o sus derivados, tales como el plásmido pBLL 15 o el plásmido pAKL15E.

45 La célula hospedante bacteriana genéticamente alterada de la presente invención es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional que controla el promotor en ausencia de la fuente de carbono inductora de dicho promotor. Puesto que el promotor del vector está controlado por la misma proteína reguladora transcripcional que el respectivo promotor cromosómico, la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el polipéptido diana continúa, incluso en ausencia de la fuente de carbono inductora.

50 Además, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido heterólogo en la célula hospedante bacteriana recombinante genéticamente alterada de la presente invención, que comprende las etapas de:

a) cultivar, bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido, la célula hospedante bacteriana genéticamente alterada de la presente invención transformada con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido unida operablemente a un promotor, en el que el promotor del vector está regulado por la proteína reguladora transcripcional que no puede ser desactivada en ausencia de la fuente de carbono específica para la proteína reguladora transcripcional, y

b) recuperar el polipéptido de las células o del cultivo celular.

Según la presente invención, la expresión del polipéptido diana comienza automáticamente en el momento en que en el medio se acaba la fuente de carbono primaria, o cuando la concentración de la fuente de carbono primaria disminuye por debajo de un nivel requerido para la CCR. Para permitir que las células sigan creciendo después de la inducción, la fuente de carbono primaria se introduce en el medio más tarde a un nivel que no permita la represión por catabolitos de carbono. Por ejemplo, la fuente de carbono primaria se introduce en una cantidad que es inmediatamente consumida por las células, de modo que, en el caldo de fermentación, casi no esté presente la fuente de carbono primaria que estimularía la CCR.

En general, puede decirse que si la cantidad de la fuente de carbono primaria presente en el medio es mayor que 1,0 g/l se observa represión por catabolitos, mientras que si la cantidad es de 0,01 g/l o menor no se produce represión por catabolitos de carbono. Puesto que el límite de la represión por catabolitos de carbono y la inducción del promotor se correlaciona con la velocidad de crecimiento de las células que, a su vez, se correlaciona con la cantidad de fuente de carbono primaria introducida en el medio o presente en el medio, la cantidad de fuente de carbono primaria que no provoca la represión por catabolitos de carbono puede ajustarse controlando la velocidad de crecimiento. Si a una velocidad de crecimiento concreta se produce la represión por catabolitos de carbono, entonces la cantidad de fuente de carbono primaria añadida al medio debe reducirse, reduciendo con ello la velocidad de crecimiento hasta que se observe un valor en que no se produce la represión por catabolitos de carbono.

Para la mayoría de los procesos de fermentación, en la fase de inducción resulta adecuado el ajuste de la adición de la fuente de carbono primaria hasta una cantidad que produzca una velocidad de crecimiento específica de $\mu \leq 0,2 \text{ h}^{-1}$.

En cualquier caso, para un proceso de fermentación específico puede determinarse con facilidad un valor adecuado para una velocidad de crecimiento específica μ mediante la experimentación habitual.

Los vectores usados, así como la construcción y la transformación del hospedante, son como se definió anteriormente.

Como sistema de cultivo de células, un sistema continuo o discontinuo, tal como un cultivo discontinuo o un cultivo de alimentación discontinua, puede realizarse en tubos de cultivo, matraces de agitación o fermentadores bacterianos, etc. Preferiblemente, en la fase de inducción cuando se expresa el polipéptido diana, la fuente de carbono primaria se introduce exponencialmente en el medio de cultivo.

Para cultivar las células hospedantes bacterianas genéticamente alteradas pueden emplearse medios convencionales, tal como se conoce en la técnica, tales como medios complejos como "medio de caldo de cultivo de levaduras nutriente", un medio que contiene glicerol, tal como describen Kortz *et al.*, J. Biotechnol. (1995), 39:59-65, un medio de sales minerales según describen Kulla *et al.*, Arch. Microbiol., (1983), 135:1, un medio LB según describen Bertani *et al.*, J. Bacteriol. (1951), 62:293-300, o un medio discontinuo para la fermentación de *E. coli* según describen Wilms *et al.*, Biotechnol. Bioeng., (2001), 73:95-103.

El medio comprende una fuente de carbono adecuada, por ejemplo, un azúcar, tal como glucosa, para cultivar la célula hospedante hasta una densidad celular deseada. Como fuente de carbono se emplea una fuente de carbono primaria para la respectiva célula hospedante, que es diferente del inductor, que es una fuente de carbono secundaria para dicha célula hospedante.

El medio puede modificarse según sea apropiado, por ejemplo, añadiendo otros ingredientes, tales como tampones, sales, vitaminas, aminoácidos, antibióticos u otros micronutrientes, tal como conocen en general los expertos en la técnica. También pueden utilizarse diferentes medios o combinaciones de medios durante el cultivo de las células.

En una realización de la invención, se añaden casaminoácidos al medio de cultivo. Se ha descubierto que la presencia de casaminoácidos en el medio puede ayudar a suprimir la expresión de nivel basal. Generalmente, los casaminoácidos pueden añadirse en una cantidad del 0,05% al 0,1% (en p/v).

Según una realización del presente método para producir un polipéptido heterólogo, puede utilizarse una célula hospedante bacteriana que comprende los genes que codifican el operón de manosa en su genoma, es decir, para la cual la manosa es una fuente de carbono secundaria y para la cual, por ejemplo, la glucosa es la fuente de carbono primaria. Para ser adecuada como hospedante para el presente método, la célula bacteriana se transforma para que sea incapaz de desactivar ManR, la proteína reguladora transcripcional que controla los promotores del operón de manosa. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos *manP* que codifica ManP puede delecionarse, inhibiendo con ello la desactivación de ManR por la fosforilación a través de ManP.

En una célula hospedante bacteriana con *manP* delecionado se introduce un vector que comprende el promotor *PmanR* o el promotor *PmanP* unido operablemente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido diana.

La célula hospedante bacteriana recombinante se cultiva en un medio de cultivo adecuado para dicha célula hospedante bacteriana, en el que el medio de cultivo puede contener glucosa y/o puede introducirse glucosa en el

medio de cultivo en una cantidad suficiente para permitir que la célula hospedante bacteriana se multiplique y reprima la expresión del polipéptido diana a través de la represión por catabolitos de carbono mediada por glucosa del promotor de manosa contenido en el vector.

5 En cuanto el nivel de glucosa del medio disminuye por debajo de un valor requerido para la represión por catabolitos de carbono, la represión por catabolitos de carbono del promotor de manosa se libera y el promotor de manosa comienza la expresión del polipéptido sin necesidad de inducción por la manosa. Además, puesto que en el genoma bacteriano, la secuencia de ácido nucleico que codifica ManP está deletada, el promotor de manosa no puede ser desactivado por la fosforilación a través de ManP. Así, el presente método permite la expresión de un polipéptido
10 diana bajo el control de un promotor inducible por una fuente de carbono específica sin la presencia de la fuente de carbono inductora.

Generalmente, durante la fase de inducción en el proceso de fermentación que emplea una célula hospedante bacteriana transformada con un vector que comprende un promotor del operón de manosa, la glucosa, siendo la fuente de carbono primaria de los promotores del operón de manosa, puede ser introducida en el medio de fermentación en una cantidad que produzca una velocidad de crecimiento específica $\mu \leq 0,2 \text{ h}^{-1}$. Además, se prefiere la alimentación exponencial.
15

La presente invención resulta ventajosa porque los promotores que controlan la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el polipéptido diana permiten una regulación estrecha.

La adición o la presencia de la fuente de carbono inductora no es necesaria.

20 Según la presente invención, el promotor está en estado activo incluso sin fuente de carbono inductora, es decir, en ausencia del inductor.

El promotor de manosa *P_{manP}* del operón de manosa de *B. subtilis* ha demostrado ser un promotor fuerte. Se ofrece un análisis detallado del operón de manosa en Sun T. *et al.*, "Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*", J. Bacteriol., 192, 2010, 2128-2139.

25 Las propiedades de control fuerte de la expresión de genes por *P_{manP}* capacita a este promotor para la producción heteróloga de polipéptidos valiosos. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que un sistema de expresión de *B. subtilis* que incluya al operón de manosa requiere una elevada cantidad de manosa para obtener unas tasas de expresión alta permanentes. Se supone que la razón del rápido consumo del inductor manosa es porque la manosa es una de las fuentes de carbono favoritas de *B. subtilis*. Sin embargo, la manosa es un azúcar bastante caro, lo cual provoca que este sistema de expresión sea económicamente inviable para aplicaciones industriales a gran escala.
30

Tal como se indicó anteriormente, un sistema de expresión ventajoso concreto sería un sistema que fuera autoinducible, es decir, que ya no necesitase un inductor. Según una realización preferida de la presente invención, dicho sistema de expresión autoinducible se obtiene haciendo que, en el operón de manosa del genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen *manP* sea incapaz de desactivar la proteína reguladora ManR evitando la fosforilación de los dominios similares y EIIA y EIIB de ManR por ManP.
35

Preferiblemente, el gen cromosómico *manP* se deleta (mutante inactivado, "knockout").

40 En este sistema de expresión, el promotor *P_{manP}* solo está bajo el control regulador de la CCR realizado por la glucosa. Hasta que la glucosa se convierte en limitante, el regulador ManR no puede unirse a su sistema operador y comenzar la expresión. Este sistema de expresión autoinducible es muy valioso para aplicaciones industriales, puesto que apenas se produce una expresión de genes prematura.

Por ejemplo, en una fermentación de alimentación discontinua, casi no se observa expresión no deseada en la fase discontinua y no es necesaria la adición de ningún inductor para obtener altos niveles de expresión a lo largo de la fase de alimentación discontinua. Este sistema de expresión es particularmente adecuado para fermentaciones de muchas células y permite obtener unas elevadas tasas de expresión.

45 El nuevo sistema de expresión proporcionado por la presente invención, en particular, el nuevo sistema de autoinducción, realiza una contribución considerable a la mejora en el rendimiento del producto y a la reducción de los costes asociados con su aplicación técnica.

50 Tal como se demuestra en los siguientes ejemplos, la presente invención proporciona la producción de polipéptidos heterólogos mediante el cultivo de la célula hospedante bacteriana genéticamente alterada de la presente invención, en el que, durante el crecimiento de las células hospedantes bacterianas genéticamente alteradas y antes de la inducción, solo se produce una expresión prematura muy baja del polipéptido, o no se produce en absoluto, es decir, casi no se produce pérdida del promotor que controla la expresión de los genes que codifican el polipéptido. Además, la producción del polipéptido comienza inmediatamente después de la autoinducción en elevadas tasas de productividad con una alta productividad final.

La anterior descripción se entenderá mejor remitiéndose a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo ejemplos de métodos de practicar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

I) Aislamiento e identificación de las regiones de promotores del promotor *manR* y el promotor *manP* del operón de manosa

5 A menos que se indique lo contrario, se han empleado los siguientes materiales y métodos:

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se emplearon *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron C. *et al.*, Gene, 33, 1985, 103-119) y *Bacillus subtilis* 3NA, una cepa no esporulante de *B. subtilis* con una mutación en el gen *spo0A* (Michel J. F. *et al.*, J. Appl. Bacteriol., 33, 1970, 220-227) como hospedantes principales para la clonación y la expresión. Otras cepas empleadas para los experimentos de fermentación fueron *B. subtilis* 3NA cepas mutantes TQ281 (*spo0A Δ manA:: ermC*) (Sun T. *et al.*, J. Bacteriol., 192, 2010, 2128-2139) y TQ356 (*spo0A Δ manP:: ermC*) (véase a continuación II, experimento 4, b). Las cepas se cultivaron a 37°C en medio LB (Bertoni G., J. Bacteriol., 62, 1951, 293-300).

Las condiciones de selección fueron las siguientes: 100 µg ml⁻¹ de ampicilina, 100 µg ml⁻¹ de espectinomicina, 5 µg ml⁻¹ de eritromicina.

15 Para la inducción del promotor de manosa, se añadió D-manosa esterilizada por filtración o sometida a autoclave hasta una concentración final del 0,2% en p/v.

Materiales

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania), Fluka (Buchs, Alemania) o Merck (Darmstadt, Alemania). Los oligonucleótidos de ADN sintéticos se adquirieron en Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania). Las enzimas de restricción y las enzimas modificadoras del ADN se adquirieron en Roche Applied Science (Mannheim, Alemania) o New England Biolabs (Frankfurt am Main, Alemania). Las PCR se realizaron con ADN polimerasa High Fidelity de Fermentas (ST. Leon-Rot, Alemania) en un miniciclador TM de MJ Research Inc. (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Preparación del ADN y transformación

25 El aislamiento del ADN de *E. coli* y *B. subtilis* o del gel de agarosa se realizó con kits de preparación de ADN de Qiagen (Hilden, Alemania) o Roche (Mannheim, Alemania) según indica el fabricante. Se emplearon técnicas moleculares convencionales en los ejemplos.

E. coli se transformó con un ADN plasmídico como se describe en Chung C.T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1989, 2172-2175. *B. subtilis* se transformó con un ADN plasmídico según el "método Paris" modificado (Harwood C.R., Molecular Biological Methods for *Bacillus*, 1990, John Wiley & Sons Ltd., Reino Unido).

Medición de la actividad β-galactosidasa

Se trataron 0,1 ml de las células que se van a estudiar con 900 µl de tampón-Z y 10 µl de tolueno durante 30 min a 37°C. La actividad β-galactosidasa se determinó con o-nitrofenil-β-galactopiranosido a 22°C según el método de Miller (Miller J. H., 1972, Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor, NY).

35 Oligonucleótidos (cebadores) utilizados

Tabla 1

Oligonucleótido	Secuencia	Objetivo
s4693	5'-AAA AAA ACG CGT GTT TAA ACT GAA TTT CTG CTG AAT ATA CA-3'	Amplificación con PCR de <i>manR</i> de <i>B. subtilis</i>
s4694	5'-AAA AAA TCT AGA AAG TGT GAA TAA TAA GAT CTT G- 3'	Amplificación con PCR de <i>manR</i> de <i>B. subtilis</i>
s4802	5'-AAA AAA ACT AGT GTT TAA ACA GGG AAA AAT GCC TTT ATT AC-3'	Cebador directo para la amplificación de <i>P_{manP}</i>
s4833	5'-AAA AAA GTT TAA ACC CCT GGC GAA TGG CGA T-3'	Amplificación de <i>spc</i> del plásmido pDG1730
s4835	5'-AAA AAA GAA TTC ATT AGA ATG AAT ATT TCC CAA AT-3'	Amplificación de <i>spc</i> del plásmido pDG1730

ES 2 636 910 T3

Oligonucleótido	Secuencia	Objetivo
s4956	5'-AAT TGC GTC GAG ACC CCT GTG GGT CTC GTT TTT TGG ATC CGG CGC CCA CGT GGC TAG CC-3'	Inserción del terminador <i>tufA</i>
s4957	5'-TTA AGG CTA GCC ACG TGG GCG CCG GAT CCA AAA AAC GAG ACC CAC AGG GGT CTC GAC GC-3'	Inserción del terminador <i>tufA</i>
s5006	5'- Cy5 -TAG CCT TTT TTA TAG TTG TTC AGC CAC TGT- 3'	Cebador marcado para la extensión con cebadores
s5007	5'- Cy5 -ATC CAC GCC ATA ATG CAT GCC GCC ATT AAT- 3'	Cebador marcado para la extensión con cebadores
s5019	5'-tta agC TCT TAA GGAG GAT TTT AGA ATG GCT AAA GAA AAA TTCg-3'	Región TI de <i>tufA</i>
s5020	5'-tta agG AAT TTT TCT TTA GCC ATT CTA AAA TCC TCC TTA AGA Gg-3'	Región TI de <i>tufA</i> (compl.)
s5069	5'-AAA AAA GAA TTC GAT ATC AGA TCT ACG CGT TAA CCC GGG C-3'	PCR del gen de resistencia a eritromicina
s5070	5'-AAA AAA CAA TTG AAT CGA TTC ACA AAA AAT AGG- 3'	PCR del gen de resistencia a eritromicina
s5071	5'-AAA AAA AGA TCT CAT GGC AGG GCT TGA GAA-3'	Deleción de <i>manA</i>
s5072	5'-AAA AAA GAA TTC TTA TTT ACC TCT GTG CTT CTT- 3'	Deleción de <i>manA</i>
s5097	5'- Cy5 -CACTGTACCCTATCTGCGAAA-3'	Cebador marcado para la extensión con cebadores
s5098	5'- Cy5 -ATTGAGATAATCCTCGATCACTT-3'	Cebador marcado para la extensión con cebadores
s5139	5'-aaa aaa tga tca TTA CTT GTA CAG CTC GTC-3'	Cebador-f de <i>PmanP-eGFP</i>
s5156	5'-aaa aaa tga tca ccg gtC GAT TGC CAC ATT AAA GG-3'	Cebador-r de <i>PmanP-eGFP</i>
s5203	5'-GATATCCTGCACCATCGTC-3'	Cebador inverso para la amplificación de <i>P_{manP}</i> para el estudio de promotores
s5208	5'-GGTACCATTCTTGCTGAATA-3'	Amplificación de la región de <i>P_{manR}</i> de pSUN279.2
s5209	5'-CTTAAGCCTGTCAGTATCTACTTGAG-3'	Amplificación de la región de <i>P_{manR}</i> de pSUN279.2
s5234	5'-aaa aaa ccg CTC GTC TTC CTA AGC ATC CT-3'	Cebador-f rep (pUB110)
s5235	5'-aaa aaa gaa tTC GAG ATC AGG GAA TGA GTT T-3'	Cebador-r rep (pUB110)
s5236	5'-tta agA ATT AAA GGA GGA ATT CAA AAT GGC AGA CAA TAA CAA Ag-3'	Región TI de <i>gsiB</i>
s5237	5'-gat ccT TTG TTA TTG TCT GCC ATT TTG AAT TCC TCC TTT AAT Tc-3'	Región TI de <i>gsiB</i> (compl.)
s5262	5'-AAA'AAA GCT AGC GTT TAA ACA AAA AGC GATT TTA ATG AGC TG-3'	Cebador directo para la amplificación de <i>P_{manP}</i>
s5362	5'-GGT ACC CCC GGG TAG CCT GGA TGG ATC AGA A- 3'	Deleción de <i>manP</i>

Oligonucleótido	Secuencia	Objetivo
s5363	5'-ACT AGT GAA TTC CTT TTC CAA TCG CA-3'	Deleción de <i>manP</i>
s5407	5'-AAA AAA GGC GCC GCT AGC TGG AGA ATA TAA CGG TT-3'	Deleción de <i>manP</i>
s5408	5'-ACA CTC CTT AAG TCT AGA AA-3'	Deleción de <i>manP</i>
s5617	5'-GGA GGG GAG AAA ACA CCT A-3'	Deleción de <i>manA</i>
s5618	5'-AAA AAA GAT ATC TCA AGA AAA TCC CCC GCT TT-3'	Deleción de <i>manA</i>
s5932	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACA GTA TAA AAA TCG CTT TTT TCC-3'	Cebador directo para la amplificación de P_{manR}
s5933	5'-AAA AAA GCT AGC GTT TAA ACC GGA AGC TTC GGT AAA AA-3'	Cebador directo para la amplificación de P_{manR}
s5934	5'-GTG CAG GAG CTC GTT ATC-3'	Cebador inverso para la amplificación de P_{manR}

Experimento 1:

Aislamiento del fragmento de ADN que porta las regiones de promotor del operón de manosa y determinación de los sitios de inicio de la transcripción del promotor *manR* y del promotor *manP*

5 El ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* 168 se aisló empleando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit de Qiagen (Hilden, Alemania).

Un fragmento de ADN de aproximadamente 2,3 kb con el gen *manR* completo y el promotor *manR* y la región intergénica entre *manR* y *manP* con el promotor *manP* se amplificó del ADN obtenido mediante PCR empleando el cebador s4693/s4694.

10 El fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 2,3 kb se empleó para un experimento de extensión con cebadores para determinar los sitios de inicio de la transcripción del promotor *manR* y del promotor *manP*.

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

En este derivado de pUB110 de alto número de copias se clonó el fragmento de ADN de 2,3 kb cadena arriba del gen de lisostafina. El plásmido resultante se denominó pSUN178.4 y se introdujo en *Bacillus subtilis* 3NA.

20 El *Bacillus subtilis* 3NA con el plásmido pSUN178.4 se cultivó en medio LB con kanamicina. En la fase de crecimiento exponencial, el cultivo se indujo con manosa al 0,2% en p/v. Después de 1 hora de crecimiento a 37°C, las células inducidas y no inducidas se recolectaron. El ARN total se aisló con el kit Qiagen-RNeasy Mini Kit.

Se emplearon los cebadores s5006, s5007, s5097 y s5098 marcados con Cy5 en el extremo 5'. Los cebadores s5006 y s5007 se hibridaron respectivamente de +21 a +50 y de +76 a +105 con respecto al codón de inicio del gen de lisostafina. Los cebadores s5097 y s5098 se hibridaron respectivamente de +81 a +101 y de +131 a +153 con respecto al codón de inicio de *manR*.

25 Se emplearon los mismos cebadores para la reacción de secuenciación del ADN plasmídico de pSUN178.4, que actuó como patrón de tamaño. Se emplearon la transcriptasa inversa de AMV y la ADN polimerasa de T7 de Roche, respectivamente, para la transcripción inversa y la secuenciación del ADN. Los productos de la transcripción inversa y de la secuenciación se analizaron en un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturizante (GE healthcare).
30 Todos los demás reactivos empleados fueron suministrados por el kit de secuenciación Amersham Pharmacia Biotech AutoRead.

El sitio de inicio de la transcripción del promotor *manP* se determinó empleando el cebador s5006. Se prepararon las reacciones de secuencia de ADN del plásmido pSUN 178.4 con el mismo cebador y se realizaron en el mismo gel desnaturizante para la comparación.

35 La figura 5 muestra la secuencia de ADN alrededor del promotor *manP* destacándose el sitio de inicio de la transcripción en A (nucleótido de adenina). Las cajas -10 y -35 deducidas aparecen en cursiva, el final del gen *manR* está marcado con una flecha, y los sitios de restricción para *Bg/II NruI*, *XbaI*, *NdeI* *AflI* están subrayados. IRI-P

indica una secuencia repetida invertida imperfecta, el sitio de unión de ManR putativo.

Se determinó el sitio de inicio de la transcripción del promotor *manR*, realizándose el aislamiento de ARN y la secuenciación del ADN como se describió anteriormente con respecto al promotor *manP*, excepto que se empleó el cebador s5098 que se une al gen *manR*.

- 5 En la figura 4 se muestra la secuencia de ADN de la región del promotor *manR* destacándose el sitio de inicio de la transcripción en G (nucleótido de guanina), las cajas -10 y -35 deducidas en cursiva, el sitio de unión ribosómico ("ribosomal binding site", RBS) subrayado, y el inicio del gen *manR* se indica con una flecha, respectivamente. Los sitios de restricción y una secuencia *cre* putativa están subrayados. IRI-R indica una secuencia repetida invertida imperfecta, el sitio de unión de ManR putativo.
- 10 La transcripción del promotor *manR* y, en particular, del promotor *manP* aumentó notablemente cuando las células fueron inducidas por manosa, tal como puede observarse por las señales mucho más fuertes en el experimento de extensión con cebadores.

Los cebadores utilizados se muestran en la anterior tabla 1.

Experimento 2

- 15 El experimento de extensión con cebadores según el experimento 1 localiza el sitio de inicio de la transcripción del promotor *manP* cerca del extremo 3' de la región intergénica entre *manR* y el comienzo de *manP*. Para determinar la región del promotor *manP* con más precisión, el fragmento de ADN de 2,3 kb se acortó paso a paso mediante amplificación con PCR, los fragmentos de secuencia obtenidos de longitudes diferentes se volvieron a clonar en el mismo vector de expresión básico y se estudió la expresión.

- 20 a) Construcción del vector de expresión básico

Se construyó un vector de expresión con *lacZ* sin promotor como gen indicador. El vector de expresión se diseñó como un vector de lanzadera capaz de replicarse en *B. subtilis* y en *E. coli* y se denominó pSUN272.1.

- 25 El gen indicador *lacZ* se cortó con *NdeI* y *XmaI* de pLA2 (Haldimann A. *et al.*, 2001, J. Bacteriol., 183, 6384-6393) y se reasoció en pJOE5531.1, un derivado del vector de expresión inducible por ramnosa pWA21 (Wegeber *et al.*, 2008, BMC. Biotechnol., 8, 2) que contiene el terminador de la transcripción de *tufA* de *B. subtilis* en el sitio *XmaI*. En este plásmido se insertó una pareja de oligonucleótidos s4956/4957 entre los sitios de restricción *AflII*/*MunI* para añadir el mismo terminador de la transcripción *tufA* cadena arriba de *lacZ*. Así, se evita la "lectura" desde los promotores del plásmido hacia *lacZ*, así como la "lectura" desde *lacZ* hacia las secuencias plasmídicas flanqueantes por los terminadores. Un gen de resistencia a la espectinomicina *spc* para *E. coli* y *B. subtilis* se amplificó desde el plásmido pDG1730 (Geurout-Fleury *et al.*, 1996, Gene, 180, 57-61) con los oligonucleótidos s4833/4835 y se insertó en el plásmido obtenido anteriormente. Además, la parte del vector de *E. coli* se acortó delecionando un fragmento *BspHI*/*HindIII*. Después, un fragmento *EcoRI*/*SphI* con la región de replicación de *B. subtilis* pMTLBS72 (Lagodich *et al.*, 2005, Mol. Biol. (Mosk), 39, 345-348) se acopló en el plásmido.

- 30 El fragmento de ADN de 2,3 kb obtenido en el experimento 1 se insertó en pSUN272.1 delante de *lacZ* mediante digestión con *AflII* y *NheI* y reasociación, obteniendo con ello el vector de expresión pSUN279.2 con el mapa de plásmido que aparece en la figura 7.

Los cebadores utilizados se muestran en la anterior tabla 1.

- b) Determinación de la eficacia de expresión del vector pSUN279.2

- 40 Los plásmidos pSUN279.2 y pSUN272.1 obtenidos en a) anterior se introdujeron en *B. subtilis* 3NA. Este último actúa como control del efecto de fondo. Las cepas de *B. subtilis* 3NA que portan uno u otro plásmido se cultivaron en medio LB con espectinomicina y, en la fase de crecimiento exponencial, se añadió manosa al 0,2%, manosa al 0,2% más glucosa al 0,2% o no se añadió azúcar (control no inducido) a los cultivos para la inducción. Después de una hora de inducción se determinó la actividad β -galactosidasa de las células mediante un ensayo de Miller. Los resultados se muestran en la figura 8.

- 45 El cultivo no inducido de *B. subtilis* que contenía pSUN279.2 ya mostraba un nivel basal bastante alto de actividad β -galactosidasa. La presencia de manosa produjo otro aumento en 4 veces de la actividad β -galactosidasa, mientras que la actividad con manosa y glucosa se redujo pero aún estaba bastante por encima del nivel basal. Los resultados indican claramente que la actividad de promotor observada en pSUN279.2 puede surgir de la región entre *manR* y *manP*, de la región cadena arriba de *manR* o de ambas.

- 50 Por tanto, la región cadena arriba de *manR*, así como la mayor parte de *manR* se delecionan de pSUN279.2 cortando el fragmento de ADN de 2,3 kb de pSUN279.2, tal como se muestra en la figura 7, entre *SfoI* y *NruI* para producir el plásmido pSUN284.1.

Se transformó *B. subtilis* 3NA con el plásmido pSUN284.1 y se determinó la eficacia de la expresión como se indicó

anteriormente. El resultado se muestra en la figura 8. Tal como puede observarse en la figura 8, este vector pSUN284.1 con *manR* delecionado mostró en *B. subtilis* 3NA solo aproximadamente la mitad del nivel basal de actividad β -galactosidasa, comparado con pSUN279.2 en *B. subtilis* 3NA, un aumento aún mayor en la inducción por manosa y de nuevo una mayor reducción en presencia de glucosa. Estos resultados demuestran que el promotor *manP* está localizado entre *manR* y *manP* y que la copia cromosómica de *manR* es suficiente para regular todas las copias del promotor *manP* en los plásmidos de bajo número de copias.

c) Localización de la región de promotor *manP*

Para localizar la región de promotor de *manP*, además del fragmento de ADN acortado de pSUN284.1, se prepararon otros fragmentos de secuencia acortados a partir del fragmento de ADN de 2,3 kb amplificando los fragmentos de ADN mediante PCR acortados en diferentes posiciones cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor *manP* e insertando los fragmentos en pSUN272.1 tal como se muestra en la figura 5.

La deleción cadena abajo hasta pb -81 y pb -80 cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de *manP* produjo una segunda secuencia de deleción que comprende SEQ ID NO:1.

Se realizó otra deleción cadena abajo hasta pb -41 y pb -40 cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de *manP* (tercera secuencia de deleción).

Los plásmidos que comprenden la segunda secuencia de deleción, pSUN290, y la tercera secuencia de deleción, pSUN297.5 se construyeron de una manera similar al plásmido pSUN284.1 en 2b) anterior, insertando los productos de la PCR amplificados con los cebadores s4802/s5203 y s5262/s5203, respectivamente, en pSUN272.1 a través de las enzimas de restricción *EcoRV* y *NheI*.

Los plásmidos se insertaron en *B. subtilis* 3NA y se cultivaron como se indicó anteriormente en b). Después de 1 hora de inducción se determinó la actividad β -galactosidasa de las células como se indicó en b) anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 9.

Tal como se muestra en la figura 9, ninguna de las cepas con pSUN290 y pSUN284.1 mostró una diferencia significativa con respecto a la inducción de *lacZ* por manosa. Sin embargo, en *B. subtilis* 3NA que comprende pSUN297.5, la inducción por manosa fue completamente abolida y el nivel de expresión basal fue de casi 0. A partir de estos resultados se deduce que el sitio de unión a ManR de la región de promotor de manosa *manP* está localizado entre pb -80 y -35 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *manP*.

Experimento 3: Determinación del promotor *manR*

a) Identificación de la secuencia *cre*

Puesto que la mayor parte de la CCR en Firmicutes es mediada a través de la proteína A de control de catabolitos ("catabolite control protein A", CcpA), se realizó una búsqueda de los respectivos sitios de unión (secuencia *cre*) en el operón de manosa completo empleando la función de alineamiento de ADN en el programa Clone Manager. Para el alineamiento, se empleó la secuencia consenso de *cre* 5'-VWWTGNAARCGNWWWCAWW-3'.

Solo en la región de promotor de *manR* se encontró una secuencia *cre* putativa, tal como se muestra en la figura 4, que está localizada cadena abajo de la caja -10.

b) Evaluación de la eficacia de expresión del promotor *manR*

Para evaluar la eficacia de expresión del promotor *manR* se construyó un vector de expresión similar a pSUN284.1 tal como se indicó anteriormente y se denominó pSUN291. Después, se amplificó un fragmento de ADN que incluye el promotor *manR* putativo y aproximadamente 600 pb cadena arriba de *manR* con el cebador s5208/s5209 y se empleó el ADN plasmídico linealizado de pSUN279.2 como molde y se insertó delante de *lacZ* en el plásmido pSUN272.1 mediante digestión con *KpnI* y *AflIII* y reasociación.

La secuencia de ADN se muestra en la figura 4.

El plásmido pSUN291 se introdujo en *B. subtilis* 3NA y se midió la actividad β -galactosidasa como se indicó anteriormente en los experimentos 2b).

El resultado se muestra en la figura 10. En este caso, la expresión basal ya era relativamente elevada y aumentó aún más mediante la adición en una cantidad en tres veces de manosa al 0,2%. La adición de glucosa condujo a la represión de la actividad β -galactosidasa casi hasta el nivel de expresión basal. El resultado indica que el promotor *manR* no solo es un promotor constitutivo débil sino que está sujeto a la regulación por CCR y manosa.

c) Localización de la región de promotor *manR*

Al igual que en el experimento 2c), para localizar también la región de promotor de *manR*, se prepararon fragmentos de ADN de diferente longitud a partir de la secuencia de ADN contenida en pSUN291 mediante una amplificación

con PCR del ADN con cebadores que se unen en diferentes posiciones cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor *manR* (cebador s5932 y s5933) y un cebador que se une cadena abajo en el gen *lacZ* (s5934) (figura 4).

5 Se obtuvo una primera secuencia de delección acortando la secuencia que aparece en la figura 4 cadena abajo hasta pb -82 y pb -81 cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción G, y la segunda delección se obtuvo acortando cadena abajo hasta pb -62 y pb -61 cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción G.

De forma análoga al experimento 2c), los fragmentos de la PCR se digirieron con endoR *SacI* y *NheI* y se acoplaron al ADN de pSUN279.2 digerido con las mismas enzimas de restricción, y los plásmidos resultantes se denominaron pSUN385.2 y pSUN386.9, respectivamente.

10 Cada plásmido se insertó en *B. subtilis* 3NA y se cultivó como se indica en el experimento 2b. Después de una hora de inducción se determinó la actividad β -galactosidasa de las células como se indicó en el experimento 2b. Los resultados se muestran en la figura 10. No existe una diferencia significativa con respecto a la inducción de *lacZ* por manosa de *B. subtilis* 3NA que comprende pSUN385.2, comparado con pSUN291. Sin embargo, en *B. subtilis* pSUN386.9 con la segunda secuencia de delección, la inducción por manosa fue completamente abolida y el nivel de expresión basal fue de casi 0. A partir de estos resultados se deduce que el sitio de unión a ManR de la región de promotor de manosa *manR* está localizado entre pb -81 y -35 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *manR*. El sitio de unión a ManR incluso puede solaparse con la secuencia -35, tal como aparece en los activadores de clase I, puesto que la secuencia repetida invertida encontrada en el sitio de unión propuesto se extiende hacia la secuencia -35 propuesta.

20 II) Construcción de una célula hospedante recombinante con regiones génicas genéticamente alteradas del operón de manosa

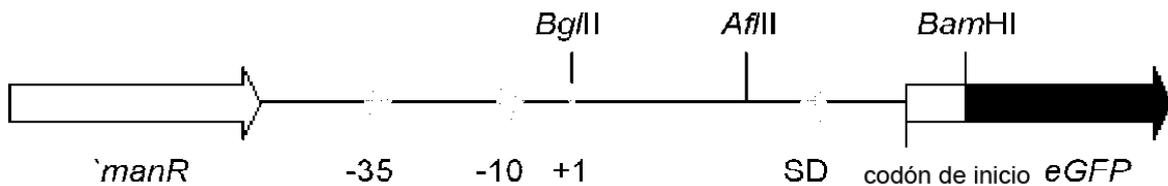
Experimento 4: Transformación

a) Construcción del plásmido pMW168.1 como vector de expresión

25 Empleando la secuencia de ácido nucleico de la región de promotor *manP* introducida en el plásmido pSUN284.1, tal como se muestra en la figura 5 y tal como se utiliza en el experimento 2c, se construyó el plásmido pMW168.1 como se indica a continuación y se introdujo en *B. subtilis* 3NA como hospedante.

30 Se diseñó un vector de lanzadera replicable en *E. coli* y *B. subtilis* tal como se indica en el experimento 2a) con la excepción de que se empleó *eGFP* como gen indicador en lugar de *lacZ*. Además, la región de inicio de la transcripción de *manP* fue sustituida por la del gen *gsiB* (proteína de estrés; Jürgen *et al.*, supra). Con ello, también el codón de inicio de *eGFP* y 6 codones que siguen al codón de inicio fueron reemplazados.

La estructura esquemática del promotor obtenido y de la región de inicio de la transcripción es la siguiente:



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

La secuencia de la región de inicio de la transcripción *gsiB* usada fue:

5'-cttaagAATTAAGGAGGAATTCAA**A**TGGCAGACAATAACAAggatcc-3'

35 *AflII* SD codón de inicio *BamHI*

En general, el plásmido pMW168.1 se obtiene como se muestra en el diagrama de flujo de la figura 15.

En el diagrama de flujo, los nombres de los vectores-ADN, las inserciones-ADN y los oligonucleótidos complementarios empleados se indican en los recuadros, y con respecto a los productos de la PCR, los cebadores y el molde-ADN se indica entre paréntesis y las enzimas de restricción utilizadas se indican en los sitios respectivos.

40 Las etapas de clonación se realizaron con *E. coli* JM109.

Los plásmidos utilizados fueron pUC18, un vector de clonación para los productos de la PCR con resistencia a ampicilina (Yanosch-Perron *et al.*, supra); pWA21, un vector de expresión y clonación para *E. coli* con resistencia a ampicilina (Wegerer *et al.*, 2008, BMC Biotechnol., 8,2); pSUN202.4, un derivado de pUB110 con la región de promotor *manP* y resistencia a *amp* y *kan*, que es un vector de lanzadera para *E. coli* y *B. subtilis*; y pSUN266.1, un

derivado de pUC18 con un sitio de integración entre las secuencias *ter* y *spc* y resistencia a *amp*.

El plásmido pSUN266.1 es un derivado del vector de expresión inducible por ramnosa pWA21 en el que el promotor de ramnosa y el gen eGFP han sido sustituidos por una secuencia que contiene dos terminadores de la transcripción del gen *tufA* de *Bacillus subtilis* en orientación directa y separados por sitios de restricción para *Bam*HI, *Sma*I y *Afl*II (véase la secuencia a continuación), así como un gen de resistencia a espectinomicina. Este último se amplificó a partir del plásmido pDG1730 (Cuerout-Fleury *et al.*, 1996) con los cebadores s4833 y s4835 (tabla 1). En la construcción final de pMW168, el promotor de manosa y el gen eGFP se insertan entre las dos secuencias de terminación de la transcripción *tufA*.

*Bam*HI *Sma*I *Afl*II

AATTGCGT**CGAGACCCCTGTGGGTCTCGTTTTTGGATCCCCGGGACGTCGAGACCCCTGTG**

10 TTAACGCAGCTCTGGGGAC**CCCAGAGCAAAAAACCTAGGGGCCCTGCAGCTCTGGGGACAC**

*Pme*I *Hind*III

GGTCTCGTTTTTGTTAAACAAGCTT

CCAGAGCAAAAAACAAATTTGTTTCGAA

Secuencia de nucleótidos de las dos secuencias terminadoras *tufA* (negrita, cursiva) y sitios de restricción entre la secuencia y al final de esta (subrayado).

15 La sustitución de la región de inicio de la transcripción que incluye el codón de inicio y los codones que siguen al codón de inicio se realizó empleando oligonucleótidos complementarios y a través de los sitios de restricción individuales *Bgl*II, *Afl*II y *Bam*HI. La construcción del vector comenzó con la sustitución de la región de inicio de la transcripción del gen 10 de T7 del vector pWA21 (Wegerer *et al.*, supra) por la región de inicio de la transcripción de *tufA* de *B. subtilis* mediante los oligonucleótidos complementarios s5019 y s5020, respectivamente. En posteriores etapas de clonación, esta región de inicio de la transcripción fue reemplazada por la de *gsiB* (oligonucleótidos s5236/s5237). El plásmido final pMW168.1 contenía el gen *rep* que incluye ori+ de pUB110.

El mapa de plásmido de pMW168.1 en la figura 11.

b) Cepa mutante de delección que carece de *manP* (Δ *manP*)

b1) Vector de inserción para la delección de *manP*

25 Se empleó el vector de inserción pSUN356.7 para deleccionar el gen *manP* que codifica la EII específica de manosa del operón de manosa sobre el cromosoma de *B. subtilis* NA deficiente en la esporulación, y la cepa obtenida se denominó *B. subtilis* TQ356 (*spo0A manP::ermC*). Se empleó un módulo de resistencia a eritromicina como marcador de selección.

30 El vector pSUN356.7 es un derivado de pUC18 (resistencia a ampicilina) y contiene un gen de resistencia a eritromicina flanqueado por secuencias de *manR* y *manA* y, fuera del módulo de sustitución, un gen de resistencia a espectinomicina. El gen de resistencia a espectinomicina se amplificó a partir de pDG1730 (véase anteriormente para pSUN266.1). El gen de resistencia a espectinomicina fue amplificado a partir del plásmido pDG1730 por los cebadores s5069 y s5070.

35 El extremo C-terminal del gen *manR* fue amplificado a partir de ADN de *Bacillus subtilis* por los cebadores s5407 y s5408 y se insertó en un lado del gen de eritromicina. El extremo N-terminal de *manA* fue amplificado a partir del cromosoma de *Bacillus subtilis* por los cebadores s5362 y s5363 y se insertó en el otro lado del gen de resistencia a eritromicina.

El mapa de plásmido de pSUN356.7 se muestra en la figura 12.

b2) Transformación

40 *B. subtilis* TQ356 según el anterior b1) se transformó con el plásmido pMW168.1 obtenido anteriormente en a1).

Medios utilizados:

a) Mínimo de glucosa (MG):

2,0 g	(NH ₄)SO ₄
6,0 g	KH ₂ PO ₄
14,0 g	K ₂ HPO ₄

1,0 g	Na ₃ Citrato
0,2 g	MgSO ₄ *7 H ₂ O
5,0 g	Glucosa (por separado como una disolución madre al 20-50%)

b) Medio I:

9,50 ml	MG
0,20 ml	Casaminoácidos (disolución madre al 1%)
0,05 ml	MgSO ₄ (disolución madre 1 M)

c) Medio II:

8,00 ml	MG
0,10 ml	Casaminoácidos (disolución madre al 1%)
0,05 ml	MgSO ₄ (disolución madre 1 M)

5 La transformación se realizó siguiendo el protocolo de Anagnostopulos *et al.*, "Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*", J. Bacteriol. (1961), 81: 741-746. Una única colonia de cada cepa bacteriana se introdujo en 5 ml de medio I y se incubó a 37°C en un agitador rotatorio durante la noche. Se trasladó 1 ml del cultivo de la noche (DO₆₀₀ entre 1 y 2) a 8 ml de medio II en un matraz Erlenmeyer con hendiduras de 100 ml y se incubó a 37°C durante 85 min. Después se transfirió 1 ml de células competentes a tubos de ensayo de la empresa Schütt Company y se mezclaron con los respectivos vectores de inserción. Antes de mezclarse con las células competentes, los vectores de inserción habían sido cortados en un sitio no esencial con un único cortador. La mezcla obtenida se precipitó con isopropanol y se dejó acoplar a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

Después, las células transformadas obtenidas se incubaron a 37°C durante 30 min en un agitador rotatorio y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en el líquido residual y se cultivó en placa.

Experimento 5: Fermentación

15 5.1 Materiales y métodos

En general, también para los experimentos de fermentación se emplearon técnicas moleculares convencionales a menos que se indique lo contrario.

Composición de los medios empleados para la fermentación

20 El cultivo durante la noche y el precultivo n.º 1 se realizaron en medio de sales mínimo de Spizizen (SMM) (Spizizen J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 44, 1958, 1072-1078), suplementado con casaminoácidos al 0,02% (en p/v) (BD Difco™, Sparks, Maryland, EE.UU.), así como con 100 µg ml⁻¹ de espectinomicina para la selección de plásmidos y 5 µg ml⁻¹ de eritromicina para la selección de cepas (en el caso de TQ281 y TQ356). El precultivo n.º 2 y el cultivo de fermentación (discontinuo) se realizaron utilizando un medio mineral modificado de Wilms *et al.* (Wilms B. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 73, 2001, 95-103) que consiste en: 1,0 g l⁻¹ de (NH₄)₂-H-citrato, 2,0 g l⁻¹ de Na₂SO₄, 2,68 g l⁻¹ de NH₄SO₄, 0,5 g l⁻¹ de NH₄Cl, 14,6 g l⁻¹ de K₂HPO₄, 4,0 g l⁻¹ de Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 1,0 g l⁻¹ de MgSO₄ × 7 H₂O, 3 ml l⁻¹ de disolución de oligoelementos (TES), 5 g l⁻¹ de glucosa para el precultivo n.º 2, y 25 g l⁻¹ de glucosa para el medio discontinuo.

30 TES contiene 0,5 g l⁻¹ de CaCl₂, 0,18 g l⁻¹ de ZnSO₄ × 7 H₂O, 0,1 g l⁻¹ de MnSO₄ × H₂O, 10,05 g l⁻¹ de Na₂-EDTA, 8,35 g l⁻¹ de FeCl₃, 0,16 g l⁻¹ de CuSO₄ × 5 H₂O, y 0,18 g l⁻¹ de CoCl₂ × 6 H₂O. El medio de alimentación para las fermentaciones de alta densidad de células contenía 200 g l⁻¹ de glucosa, 7,89 g l⁻¹ de MgSO₄ × 7 H₂O, 40 ml l⁻¹ de TES, y 63,36 g l⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ cuando se emplea un reactor KLF. El pH se ajustó a 3,3 para asegurar la solubilidad de todos los componentes. Se emplearon dos medios de alimentación distintos cuando se utiliza un reactor de 30 l. El primer medio contenía 654,76 g l⁻¹ de glucosa × H₂O, 23,5 g l⁻¹ de MgSO₄ × 7 H₂O, 120 ml l⁻¹ de TES, y el segundo 396 g l⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄. Para la inducción del promotor de *manP*, se empleó una disolución de D-manosa al 20% (en p/v) o una disolución de alimentación distinta que contenía 200 g l⁻¹ de manosa, 7,89 g l⁻¹ de MgSO₄ × 7 H₂O, 40 ml l⁻¹ de TES, y 63,36 g l⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄.

Condiciones de precultivo y de cultivo de alimentación discontinua

Colonias individuales de placas de agar LB se inocularon en 5 ml de SMM y se incubaron durante la noche durante al menos 14 h a 37°C. Se transfirieron 25 ml de SMM a matraces de agitación de 250 ml y se inocularon con el

cultivo de la noche para lograr una densidad óptica de 0,05 (precultivo n.º 1) a 600 nm (DO_{600}). Después de 5 h de incubación a 37°C, se emplearon 20 ml del precultivo n.º 1 para inocular 200 ml del precultivo n.º 2 en matraces de agitación de 1000 ml (precultivo n.º 2). Después de 7 h más de incubación a 37°C, el medio del cultivo discontinuo se inoculó con el precultivo n.º 2

- 5 Se empleó un montaje de fermentación de alimentación discontinua y optimizado para *E. coli* con glucosa como principal fuente de carbono (Korz D. J. *et al.*, J. Bacteriol., 39, 1995, 59-65; Wilms, supra). El volumen discontinuo fue de 1,5 l cuando se emplea un fermentador de laboratorio pequeño de 3,7 litros KLF (Bioengineering AG, Wald, Suiza), y un volumen de alimentación de 1,0 l. En el caso del fermentador de laboratorio de 30 litros D598 (LF; Bioengineering AG, Wald, Suiza), el volumen discontinuo fue de 8,0 l, el medio de alimentación de glucosa de 4,2 l y el medio de alimentación de amoniaco de 1,0 l. Los medios de glucosa y amoniaco se introdujeron en el reactor en una proporción de 81%:19%. El medio de alimentación se introdujo en el biorreactor según:

$$F(t) = [(\mu_{set} / Y_{x/s}) + m] \times [(C_{x0} \times V_0) / C_{s0}] \times \exp(\mu_{set} \times t) \quad \text{Ec. 1}$$

- 15 en la que F ($l\ h^{-1}$) es la velocidad de alimentación, μ_{set} (h^{-1}) es la velocidad de crecimiento específica deseada, m ($g^{-1}\ h^{-1}$) es el coeficiente de mantenimiento específico (= 0,04 $g\ g^{-1}\ h^{-1}$), $Y_{x/s}$ es el coeficiente de rendimiento de biomasa/sustrato específico (aproximadamente 0,5 para la glucosa), C_{x0} ($g\ l^{-1}$) es la concentración de biomasa al inicio de la alimentación, V_0 (l) es el volumen del reactor al inicio de la alimentación, C_{s0} ($g\ l^{-1}$) es la concentración de glucosa en la disolución de alimentación, y t (h) es el tiempo después del inicio de la alimentación. Se eligió una velocidad de crecimiento específica μ de 0,1 h^{-1} para evitar la producción de subproductos no específicos y no deseados y para evitar la limitación del oxígeno.

- 20 La fase discontinua se realizó a 37°C hasta que la temperatura se desplazó hasta 30°C con el comienzo de la fase de alimentación discontinua para evitar la formación de cuerpos de inclusión no deseados de la proteína heteróloga expresada. El pH se ajustó a 7,0 con NH_4OH al 24% (en v/v) y H_3PO_4 al 20% (en v/v), respectivamente. El valor de pO_2 se mantuvo por encima del 50% de saturación ajustando automáticamente la velocidad del agitador. La tasa de aireación se mantuvo constante a 2 $l\ min^{-1}$ cuando se emplea el KLF, y entre 15-25 $l\ min^{-1}$ cuando se emplea el LF. La sobrepresión se mantuvo a 0,5 bares. La densidad celular se midió determinando la DO_{600} periódicamente con el espectrofotómetro de UV/visible Uttrospec™ 1100 *pro* (GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences, Reino Unido). El peso seco celular (psc) se calculó multiplicando el valor de la DO_{600} por el factor de 0,322 $g_{psc}\ l^{-1}$, que se obtuvo como un valor promedio después de varias determinaciones de la humedad con MB 835 Halogen (Ohaus Corporation, Pine Brook, Nueva Jersey, EE.UU.) durante las fermentaciones. Se empleó el paquete de software Biolog 1.7 (Institute of Biochemical Engineering, Universidad de Stuttgart, Alemania [<http://www.ibvt.uni-stuttgart.de>]) para controlar los parámetros de la fermentación. Las fermentaciones de alimentación discontinua terminaron después de aproximadamente 40 h de tiempo del proceso.

Mediciones de fluorescencia en línea y fuera de línea

- 35 Para seguir el rastro de la tasa de expresión de la eGFP recombinante producida a tiempo real, se empleó una sonda de fluorescencia (Mikropack HPX-2000, High Power Xenon Lightsource; Ocean Optics, Inc.; espectrómetro de fibra óptica S2000; Dunedin, Florida, EE.UU.) dentro del biorreactor. La longitud de onda de extinción fue de 485 nm, mientras que la emisión se detectó a 535 nm y se registró en línea con el paquete de software Spectra Suite (Ocean Optics, Dunedin, Florida, EE.UU.). La luz de fluorescencia se condujo a través de un filtro óptico con una potencia de 0,6. El tiempo de integración de la sonda fue de 50 mseg. Debido a que el software solo puede contar valores de hasta 4.000 cuentas, el tiempo de integración se redujo paso por paso junto antes de alcanzar niveles más elevados. Por tanto, los recuentos de fluorescencia se multiplicaron después por el correspondiente factor de reducción para obtener los valores que se corresponden con 50 mseg. Los valores medidos son específicos para un volumen de reactor concreto.

- 45 Además, se realizaron mediciones fuera de línea de la actividad fluorescente empleando el lector de microplacas SpectraFluor (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Por tanto, 3 × 250 μl del cultivo celular no diluido se midió en placas de 96 pocillos (Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen, Alemania) empleando 3 × 250 μl de medio discontinuo como valor de blanco (filtro de excitación: 485 nm; filtro de emisión: 535 nm; ganancia (manual): 60; tiempo de integración: 20 μ seg; número de flashes: 3; modo de lectura: superior). El promedio de los valores de blanco se restó del promedio de las muestras para obtener el valor final. El cultivo celular se diluyó en medio discontinuo en cuanto alcanzó las 20.000 cuentas.

- 50 A partir de una calibración frente a un patrón de eGFP interno purificado (aproximadamente 95% de pureza, 1,3 $g\ l^{-1}$), puede deducirse que aproximadamente 120.000 de cuentas medidas fuera de línea se corresponden con 1 $g_{eGFP}\ l^{-1}$. Puede demostrarse que existe una coherencia lineal entre los valores medidos en línea y fuera de línea que ofrece una correlación de 1,5 $g_{eGFP}\ l^{-1}$ por 7470 de cuentas medidas en línea.

- 55 *Determinación de la estabilidad del plásmido*

La estabilidad del vector pMW168.1 se determinó midiendo la fracción de las células que contienen plásmidos según Harwood y Cutting (Harwood C. R. *et al.*, Molecular Biological Methods for *Bacillus*, 1990, John Wiley & Sons Ltd.,

Chichester, Reino Unido).

Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

Los extractos de células brutos se obtuvieron como sigue: 10^{10} células se recolectaron y se centrifugaron. Las células sedimentadas se resuspendieron con 1 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5) y se solubilizaron empleando sonido ultrasónico (Heat Systems-Ultrasonics, Inc., sonicador modelo W-385, Farmingdale, Nueva York, EE.UU.; 3×30 seg, 50% de ciclo de trabajo). Se obtuvo la fracción de proteína soluble del sobrenadante después de la centrifugación, y la fracción insoluble se obtuvo resuspendiendo el sedimento con 1 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5). Las fracciones de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli U.K., Nature, 227, 1970, 680-685; LeBlanc D. J. *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 35, 1991, 1804-1810).

10 5.2 Fermentaciones de alta densidad celular empleando *B. subtilis* 3NA/pMW168.1.

Se ensayó el sistema de expresión de manosa con *B. subtilis* 3NA/pMW168.1 en fermentaciones de alimentación discontinua. Se empleó un montaje tal como se ha descrito previamente (Korz *et al.*, Wilms *et al.*, supra).

En la primera fermentación, realizada en un reactor de agitación LF, se añadió un cantidad extra de D-manosa al 0,2% (en p/v) al caldo de cultivo inmediatamente al comienzo de la fase de alimentación discontinua. La señal de fluorescencia de la sonda, que hasta ese momento no mostraba una fluorescencia significativa, aumentó con mucha rapidez justo después de la inducción. Después de alcanzar un valor máximo de aproximadamente 2.200 cuentas después de 4 h en la fase de alimentación discontinua, la señal comenzó a descender de nuevo de modo constante. Esta disminución vino acompañada del consumo del inductor (medido mediante HPLC, los datos no se muestran). Al final de proceso se produjeron $0,2 \text{ g}_{\text{eGFP}} \text{ l}^{-1}$ o $3 \text{ mg}_{\text{eGFP}} \text{ por g}_{\text{psc}}$. En una segunda fermentación, se empleó una alimentación de D-manosa exponencial adicional. Esta comenzó de modo simultáneo con la alimentación de glucosa, manteniendo la concentración global de azúcar de ambas alimentaciones tan alta como en la primera fermentación. La señal de fluorescencia comenzó justo después de la adición del inductor y se extendió hasta el final del proceso. Se añadió una cantidad global de 50 g de D-manosa al caldo del reactor para mantener este aumento. Con este régimen de inducción, se produjeron $2,1 \text{ g}_{\text{eGFP}} \text{ l}^{-1}$ o $53 \text{ mg}_{\text{eGFP}} \text{ por g}_{\text{psc}}$. Los resultados detallados de las dos fermentaciones realizadas con *B. subtilis* 3NA/pMW168.1 se resumen en la tabla que aparece en el apartado 5.5 Resultados.

La producción de eGFP aumentó a lo largo de toda la fase de alimentación, pero de modo más lento que la producción de biomasa. La comprobación de la estabilidad del plásmido reveló que aproximadamente 95% de las células aún portaban el vector al final de ambos procesos de fermentación.

30 5,3 Desarrollo y aplicación de un sistema de expresión autoinducible en la fermentación de alta densidad celular empleando la cepa ΔmanP TQ356.

La cepa de *B. subtilis* ΔmanP TQ356 muestra una expresión constitutiva bajo condiciones no inductoras desde PmanP, así como un efecto de CCR cuando está presente la glucosa (Sun T. *et al.*, supra). Esta cepa se transformó con pMW168.1, lo cual condujo a colonias fluorescente bastante pequeñas. Después de la adición de glucosa al 0,5% (en p/v) al medio de selección, el crecimiento de las colonias se normalizó. En experimentos con matraces de agitación se lograron altos niveles de expresión cuando la glucosa se acabó (los datos no se muestran).

Después se utilizó *B. subtilis* TQ356 que porta pMW168.1 para una fermentación de alimentación discontinua (figura 13). En la fase discontinua, no pudo detectarse una fluorescencia significativa similar a la fermentación discontinua de las cepas de *B. subtilis* 3NA/pMW186 y TQ281/pMW168. Cuando comienza la fase de alimentación discontinua, la señal de fluorescencia de la sonda del reactor comienza a aumentar de modo continuo. Después de 36 h de tiempo global de fermentación, el nivel de expresión en las células alcanzó un máximo, tal como puede observarse por un valor YP/X constante de 14,6% hasta el final del proceso de fermentación, lo cual se corresponde con una productividad específica constante. Se produjeron casi $10 \text{ g}_{\text{eGFP}} \text{ l}^{-1}$, que se corresponden con 146 mg de eGFP por g_{psc} sin la adición de ningún inductor. Los resultados de la fermentación se resumen y se comparan con las otras fermentaciones realizadas en la tabla que aparece en el apartado 5.5 Resultados. Se realizó una SDS-PAGE para tener una idea acerca del porcentaje de eGFP expresado en comparación con la proteína total (figura 14). Tal como puede observarse, al menos 20% de la proteína total son moléculas de eGFP. Solo una pequeña fracción es insoluble y está presente en forma de cuerpos de inclusión (figura 14, carril 7). También se analizó el sobrenadante del caldo de cultivo sin diluir mediante SDS-PAGE (figura 14, carril 8) y se midió de modo espectrofotométrico. En el sobrenadante se descubrió aproximadamente 1% de la eGFP total medida, lo cual puede ser debido a la lisis celular que se produce a lo largo del proceso de fermentación.

Se comprobó la estabilidad del plásmido y la morfología celular a lo largo del proceso de fermentación.

5.4 Resultados

Los resultados de los ensayos de fermentación de 5.2 a 5.3 se resumen en la siguiente tabla. Comparación de las fermentaciones realizadas con respecto a los diferentes regímenes de inducción y cepas de *B. subtilis* utilizadas con el vector de expresión pMW168.1.b

Cepa de <i>B. subtilis</i> con pMW 168.1	régimen de inducción	reactor de agitación	Δt_{fb} [h]	Cx, final [g _{psc} l ⁻¹]	X _{final} [g _{psc}]	C _P , final [g _{eGFP} l ⁻¹]	P _{eGFP, final} [g]	Y _{P/X} [%]	r _p [g _{psc} ⁻¹ h ⁻¹]	q _P [g _{eGFP} l ⁻¹ h ⁻¹]
3NA (<i>man</i> ⁺)	UA	FL	22,5	73	897	0,2	2,8	0,3	0,14 × 10 ⁻³	0,01
3NA (<i>man</i> ⁺)	AE	KLF	23,8	39	103	2,1	5,5	5,3	2,32 × 10 ⁻³	0,09
TQ356 (Δ <i>manP</i>)	AI	FL	23,5	67	758	9,8	111	14,6	6,23 × 10 ⁻³	0,40

b abreviaturas y descripciones de los parámetros: UA: una única adición del inductor (manosa); AE: alimentación exponencial del inductor (manosa); AI: autoinducción; final: al final del proceso de fermentación; LF: fermentador de laboratorio de 30 litros; KLF: fermentador de laboratorio pequeño de 3,7 litros; Δt_{fb} : momento/duración de la alimentación discontinua, final: al final de la fermentación; Cx, final: concentración en peso seco celular; X_{final}: peso seco celular; c_P, final: concentración del producto; P_{eGFP, final}: producto absoluto (eGFP); Y_{P/X}: producto por g de peso seco celular; r_P: productividad específica, q_P: productividad volumétrica.

Tal como muestran estos resultados, durante la fase discontinua casi no se produce expresión de la eGFP indicadora. En la fermentación autoinducible de 5.3, el inicio de la autoinducción al principio de la fase de transición con limitación de glucosa entre la fase discontinua y la fase de alimentación discontinua de la fermentación y su mantenimiento a lo largo de la fase de alimentación discontinua con limitación de glucosa interior condujo a un aumento en tres veces del rendimiento del producto hasta 146 mg GPF por g_{psc}.

5.5 Análisis

En las fermentaciones 5.2 a 5.3 se emplearon sistemas de expresión de *B. subtilis* que comprenden el promotor de manosa *PmanP* en el vector pMW 168.1 para estimular la expresión de eGFP. El promotor *PmanP* ha demostrado ser un promotor fuerte que se activa tras la adición de D-manosa.

En la fermentación 5.2, la cepa deficiente en esporulación de *B. subtilis* 3NA, que había sido transformada con este vector, condujo a unos altos niveles del producto, concretamente 2,1 g_{eGFP} l⁻¹. Comparado con un sistema recientemente descrito con *B. megaterium* (Stammen *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 76, 2010, 4037-4046), un sistema de hospedante prometedor para la producción de proteínas recombinantes, el sistema de *B. subtilis* conduce a mejores resultados. El sistema de producción de proteínas de *B. megaterium* intracelular, que es inducible por xilosa, produce 1,25 g_{GPF} l⁻¹, que se corresponde con 36,8 mg por g_{psc} en las fermentaciones de alimentación discontinua. Además, Stammen *et al.* (supra) emplean antibióticos hasta el final del proceso de fermentación, con el resultado de que no se pierden plásmidos durante el proceso de fermentación.

La fermentación 5.2 demuestra que el sistema de manosa es bastante eficaz con respecto a las productividades, pero sin embargo la única adición del inductor no conduce a unas tasas altas de expresión permanentes. Esto es debido al consumo rápido del inductor manosa, puesto que es una de las fuentes de carbono favoritas de *B. subtilis*.

Así, la presente solicitud se refiere a un método para producir un polipéptido heterólogo en la célula hospedante de *B. subtilis* deficiente en la esporulación, que comprende la etapa de transfectar la célula de *B. subtilis* deficiente en la esporulación con un vector que contiene el promotor *manP* unido operablemente a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, cultivar la célula hospedante transformada en un medio bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido y recuperar el polipéptido de la célula o del cultivo celular, en el cual la expresión del polipéptido es inducida por la adición del inductor manosa. En una realización preferida de la presente solicitud, el inductor manosa se añade al comienzo de la fase de alimentación discontinua. En otra realización preferida, el inductor manosa se añade primero al comienzo de la fase de alimentación discontinua y se realiza una segunda adición de manosa durante el crecimiento exponencial simultáneamente con la alimentación de glucosa.

En el ejemplo 5.3 se muestra un régimen de inducción que ya no necesita de inductor. Este sistema autoinducible se puso en práctica con la cepa Δ *manP* TQ356 y el vector de expresión pMW168.1.

En una cepa sin transportador, como TQ356, el promotor de manosa solo está bajo el control regulador de la CCR realizada por la glucosa que es el caso, por ejemplo, de la fase discontinua de un proceso de fermentación. Se abole el efecto regulador negativo del transportador cognado ManP. No obstante, el regulador sigue en estado inactivo siempre que esté la glucosa presente. Además, no existen cantidades suficientes de ManR puesto que el sitio del operador *manR* está bloqueado. Hasta que la glucosa se convierte en limitante, el regulador ManR no puede unirse a su sistema operador y comenzar la expresión. Este sistema de autoinducción hace que sea innecesario el inductor, bastante caro. Esta estrategia de inducción sofisticada es muy prometedora para aplicaciones industriales, puesto que no se produce una significativa expresión basal en la fase discontinua y no es necesaria la adición de ningún inductor para obtener altos niveles de expresión a lo largo de la fase de alimentación discontinua.

Más allá de esto, además pueden obtenerse unas tasas de expresión relativamente altas combinadas con unas productividades altas, comparado con la fermentación 5.2. Pueden producirse casi 10 g l^{-1} de proteína recombinante (eGFP) que se corresponde con $146 \text{ mg}_{\text{eGFP}}$ por g_{psc} . El producto se distribuyó de forma homogénea en las células debido a su solubilidad, tal como puede observarse mediante microscopía de fluorescencia y análisis de SDS-PAGE.

5 La alta tasa de expresión, es decir, la alta productividad, puede mantenerse a un nivel elevado constante hasta el final del proceso de fermentación.

Así, la presente solicitud se refiere además a un método para producir un polipéptido heterólogo en una célula hospedante de *B. subtilis* sin transportador, tal como una célula deficiente en el gen *manP*, que comprende la etapa de transfectar la célula de *B. subtilis* sin transportador con un vector que contiene el promotor *manP* unido operablemente a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, cultivar la célula hospedante transformada en un medio bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido y recuperar el polipéptido de la célula o del cultivo celular, por lo cual la expresión del polipéptido no es inducida por manosa, sino que está bajo el control de la glucosa.

10

Listado de secuencias

- 15 <110> Lonza AG
 <120> Regulación de promotores inducibles
 <130> 9200-9329
 <150> EP11162420.1
 <151> 14-04-2011
- 20 <150> EP10171252.9
 <151> 29-07-2010
 <160> 45
 <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
 <211> 143
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
- <400> 1
 tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60
 tttcgggtata cagttgagac aagatcttat tattcacact ttctagaaat aattttctta 120
 agaaggagat atacatatga cac 143
- 30 <210> 2
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
- <400> 2
 tagggaaaaa tgcctttatt accggaacct atggtaaaaa aagcgatttt aatgagctga 60
- 35 tttcgggtata cagttgagac 80
- <210> 3
 <211> 195
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis
- 40 <400> 3

ES 2 636 910 T3

	tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt	60
	ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac	120
	ggtttcttat atagtatact tatactatca atttgctcaa gtagatactg acaggcttaa	180
	gaaggagata tacat	195
	<210> 4	
	<211> 128	
	<212> ADN	
5	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 4	
	tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt	60
	ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac	120
	ggtttctt	128
	<210> 5	
	<211> 121	
10	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 5	
	tgaatttctg ctgaatatac attacatagc aaactcaaag agtataaaaa tcgctttttt	60
	ccggaagctt cggtaaaaaa cgaaactttt gtctctatga ttttgtttta taatgtaaac	120
	g	121
	<210> 6	
15	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	
	<400> 6	
	aaaaaacgc gtgttaaac tgaatttctg ctgaatatac a	41
20	<210> 7	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> cebador s4694	
	<400> 7	
	aaaaaatcta gaaagtgtga ataataagat ctg	34
	<210> 8	
	<211> 41	
30	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador s4802	
	<400> 8	
35	aaaaaacta gtgttaaac agggaaaaat gcctttatta c	41
	<210> 9	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 636 910 T3

<220>
 <223> cebador s4833

 <400> 9
 aaaaaagttt aaaccctgg cgaatggcga t 31

 5 <210> 10
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 10 <223> cebador s4835

 <400> 10
 aaaaaagaat tcattagaat gaatattcc caaat 35

 <210> 11
 <211> 59
 15 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador s4956

 <400> 11
 20 aattgcgtcg agaccctgt ggtctcgtt tttggatcc ggcgcccacg tggctagcc 59

 <210> 12
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> cebador s4957

 <400> 12
 ttaaggctag ccacgtggc gccgatcca aaaaacgaga cccacagggg tctcgacgc 59

 <210> 13
 30 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador s5006

 35 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (1)..(1)
 <223> Cy marcado

 <400> 13
 40 tagcctttt tatagttgtt cagccactgt 30

 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

 45 <220>
 <223> cebador s5007

 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (1)..(1)
 50 <223> cy marcado

 <400> 14

ES 2 636 910 T3

atccacgcca taatgcatgc cgccattaat 30

<210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 5 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5019

<400> 15
 ttaagctctt aaggaggatt ttagaatggc taaagaaaaa ttcg 44

10 <210> 16
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 15 <223> cebador s5020

<400> 16
 ttaaggaatt tttcttagc cattctaaaa tcctccttaa gagg 44

<210> 17
 <211> 40
 20 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5069

<400> 17
 25 aaaaaagaat tcgatatcag atctacgcgt taaccggggc 40

<210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> cebador s5070

<400> 18
 aaaaaacaat tgaatcgatt cacaaaaaat agg 33

35 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5071

40 <400> 19
 aaaaaaagat ctcattggcag ggcttgagaa 30

<210> 20
 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5072

<400> 20
 aaaaaagaat tcttatttac ctctgtgctt ctt 33

50 <210> 21

<211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> cebador s5097

 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (1)..(1)
 <223> Cy marcado

 10 <400> 21
 cactgtaccc tatctcgaa a 21

 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador s5098

 <220>
 <221> característica_nueva
 20 <223> Cy marcado

 <400> 22
 attgagataa tcctcgatca ctt 23

 <210> 23
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador s5139

 <400> 23
 30 aaaaaatgat cattactgt acagctcgtc 30

 <210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial

 35 <220>
 <223> cebador s5156

 <400> 24
 aaaaaatgat caccggtcga tgccacatt aaagg 35

 <210> 25
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador s5203

 45 <400> 25
 gatatcctgc accatcgtc 19

 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> artificial

 <220>

<223> cebador s5208

<400> 26
 ggtaccattt cttgctgaat a 21

5 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5209

10 <400> 27
 cttaacgctg tcagtatcta cttgag 26

<210> 28
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5234

<400> 28
 aaaaaaccgc tcgtcttct aagcatcct 29

20 <210> 29
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 25 <223> cebador s5235

<400> 29
 aaaaaagaat tcgagatcag ggaatgagtt t 31

<210> 30
 <211> 44
 30 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5236

<400> 30
 35 ttaagaatta aaggaggaat tcaaatggc agacaataac aaag 44

<210> 31
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 40 <223> cebador s5237

<400> 31
 gatccttgt tattgtctgc cattttgaat tcctcctta atc 44

<210> 32
 45 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador s5262

50 <400> 32

ES 2 636 910 T3

aaaaaagcta gcgtttaaac aaaaagcgat ttaatgagc tg 42
 <210> 33
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador s5362
 <400> 33
 ggtacccccg ggtagcctgg atggatcaga a 31
 10 <210> 34
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador s5363
 <400> 34
 actagtgat tcttttcca atcgca 26
 <210> 35
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador s5407
 <400> 35
 25 aaaaaaggcg ccgctagctg gagaatataa cggtt 35
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> cebador s5408
 <400> 36
 acactcctta agtctagaaa 20
 <210> 37
 35 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador s5617
 40 <400> 37
 ggaggggaga aaacaccta 19
 <210> 38
 <211> 32
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador s5618
 <400> 38
 aaaaaagata tctcaagaaa atccccgct tt 32
 50 <210> 39

ES 2 636 910 T3

<211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> cebador s5932

 <400> 39
 aaaaaagcta gcgtaaac agtataaaaa tcgcttttt cc 42

 <210> 40
 <211> 38
 10 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador s5933

 <400> 40
 15 aaaaaagcta gcgtaaac cggaagcttc ggtaaaaa 38

 <210> 41
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> cebador s5934

 <400> 41
 gtgcaggagc tcgttatc 18

 <210> 42
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia consenso de *cre*

 30 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 35 <221> característica_nueva
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 40 <221> característica_nueva
 <222> (11)..(11)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 42
 wwtgnaarcg nwwwcaww 18

 <210> 43
 45 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Bacteriófago T7

 <400> 43
 ctaagaatt aaaggaggaa tcaaaatgg cagacaataa caaaggatcc 50

 50 <210> 44
 <211> 89
 <212> ADN

ES 2 636 910 T3

<213> artificial

<220>

<223> secuencia 5-3

<400> 44

aattgcgtcg agaccctgt ggtctcgtt tttggatcc cgggacgtc gagaccctg 60

5 tgggtctcgt tttttgttta aacaagctt 89

<210> 45

<211> 89

<212> ADN

<213> artificial

10 <220>

<223> complementario a SEQ ID No. 44

<400> 45

ttaacgcagc tctggggaca cccagagcaa aaaacctagg ggccctgcag ctctggggac 60

accagagca aaaaacaaat ttgttcgaa 89

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para producir un polipéptido heterólogo en una célula hospedante bacteriana recombinante,
 en el que se emplea una célula hospedante bacteriana recombinante cuyo catabolismo de las fuentes de carbono está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono y del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa, y que está alterada genéticamente de modo que es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional específica para un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria en ausencia de la fuente de carbono secundaria inductora, y que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor, que es inducible por la fuente de carbono secundaria y es regulado por la proteína reguladora transcripcional,
- 5
- 10 y dicho método comprende las etapas de cultivar la célula hospedante bacteriana en un medio de cultivo celular que no comprende la fuente de carbono secundaria inductora, sino una fuente de carbono primaria, inducir la expresión de dicho polipéptido por la fuente de carbono primaria en un momento en que la concentración de la fuente de carbono primaria disminuye por debajo de un nivel requerido para la represión por catabolitos de carbono,
- 15 en el que la fuente de carbono primaria se añade al cultivo en una cantidad suficiente para mantener una velocidad de crecimiento predeterminada de la célula hospedante bacteriana sin la inducción de la represión por catabolitos de carbono,
- y recuperar el polipéptido de las células o del cultivo celular.
- 2.- El método según la reivindicación 1,
- 20 en el que se emplea una célula hospedante bacteriana, en la cual, mediante una alteración genética, se evita la desactivación de la proteína reguladora transcripcional por la fosforilación realizada por la enzima EII, que es específica para dicha proteína reguladora transcripcional.
- 3.- El método según la reivindicación 2,
- 25 en el que i) en el genoma de la célula hospedante bacteriana, se deletiona el gen que codifica la enzima de transferencia del grupo fosforilo EII que es específica para la proteína reguladora transcripcional, o
- en el que ii) en el genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional se altera genéticamente de modo que la proteína reguladora transcripcional expresada por dicho gen es incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido desde la enzima EII.
- 4.- El método según la reivindicación 3,
- 30 en el que, en el caso i), se integra en el vector el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional que controla el promotor del vector; o
- en el que, en el caso ii), se integra en el vector el gen manipulado genéticamente de la célula hospedante bacteriana que codifica la proteína reguladora transcripcional incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido desde la correspondiente enzima EII.
- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- 35 en el que la célula hospedante bacteriana se selecciona de Bacilli, Clostridia y Escherichia.
- 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5,
- en el que el medio de cultivo comprende casaminoácidos.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- 40 en el que el promotor inducible por una fuente de carbono es un promotor del operón de manosa, y en el que la fuente de carbono inductora es la manosa.
- 8.- El método según la reivindicación 7,
- en el que el promotor es el promotor P_{manP} o el promotor P_{manR} del operón de manosa.
- 9.- El método según la reivindicación 8,
- 45 en el que i) en el genoma de la célula hospedante bacteriana, se deletiona el gen que codifica manP, o
- en el que ii) en el genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional ManR se altera genéticamente de modo que la ManR expresada por dicho gen es incapaz de unirse

a un grupo fosforilo transferido desde la enzima EII específica.

5 10.- Una célula hospedante bacteriana recombinante cuyo catabolismo de las fuentes de carbono está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono y del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa, y que está alterada genéticamente de modo que es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional específica para un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria en ausencia de la fuente de carbono secundaria inductora mediante la delección, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, mediante la delección, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, del gen que codifica una enzima de transferencia del grupo fosforilo EII específica para la proteína reguladora transcripcional, y que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor, que está regulado por la proteína reguladora transcripcional por la cual la célula hospedante bacteriana ha sido genéticamente alterada para que sea incapaz de la desactivación, y en la que en el vector se integra el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional específica.

15 11.- Una célula hospedante bacteriana recombinante, cuyo catabolismo de las fuentes de carbono está bajo el control de la represión por catabolitos de carbono y del sistema de fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa, y que esta alterada genéticamente de modo que es incapaz de desactivar la proteína reguladora transcripcional específica para un promotor inducible por una fuente de carbono secundaria en ausencia de la fuente de carbono secundaria inductora alterando genéticamente, en el genoma de la célula hospedante bacteriana, el gen que codifica la proteína reguladora transcripcional, de modo que la proteína reguladora transcripcional expresada por dicho gen es incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido por la enzima EII, que es específica para dicha proteína reguladora transcripcional, y que comprende un vector con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido unida operablemente a un promotor regulado por la proteína reguladora transcripcional por la cual la célula hospedante bacteriana ha sido genéticamente alterada para que sea incapaz de la desactivación, y
20 en la que en el vector se integra además el gen manipulado que codifica la proteína reguladora transcripcional incapaz de unirse a un grupo fosforilo transferido por la correspondiente enzima EII.

25

Estructura de operón (manosa)

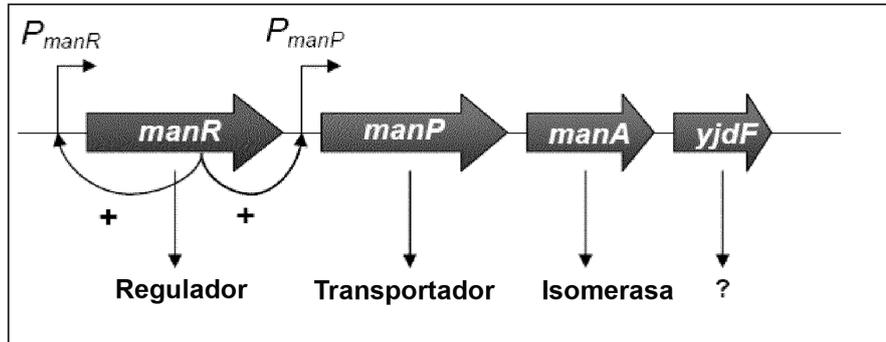


Fig. 1

Catabolismo de la manosa

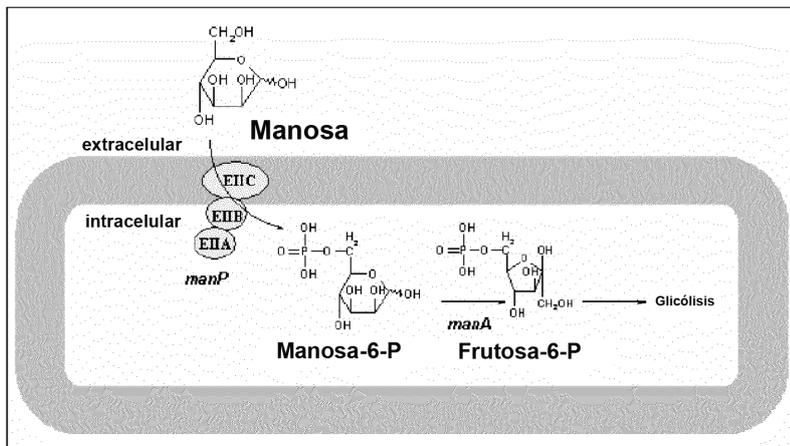


Fig. 2

```

TTTTATCTCA TTGGATTAT TAAAAGCAGG GATTATTCCT TGCTTTTTTT
                manR → -35
GTTATAGGGA AAAATGCCTT TATTACCGGA ACCTATGGTA AAAAAAGCGA
                -10 +1 EgII
TTTTATGAG CTGATTTCCG TA TACAGTG AGACAAGATC TTATTATTCA
        XbaI                AflII                NdeI
CACTTCTAG AAATAATTTT CTTAAGAAGG AGATATACAT ATGACACATG
                Lysa_Bs →
    
```

Fig. 3

```


| pSUN291 → | pSUN384_1 → | pSUN385_2 →


TGAATTTCTG CTGAATATAC ATTACATAGC AACTCAAAG AGTATAAAAA

```

```


| pSUN386_9 HindIII | -35


TCGCTTTTTT CCGGAAGCTT CCGTAAAAAA CGAAACTTTT GTCTCTATGA

```

```

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

```

```

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

Fig. 4

```

        HindIII                -35
TTTTTCCGGA AGCTTCGGTA AAAACGAAA CTTTGGTCTC TATGATTTTG
        -10 CRE +1
TTTTA TAATG TAACGGTTT CTTATATAGT AACTTATAC TATCAATTTG
CTCAAGTAGA TACTGACAGG AAGGATAGAA AAACAGATGG AATACATAAA
                manR →
    
```

Fig. 5

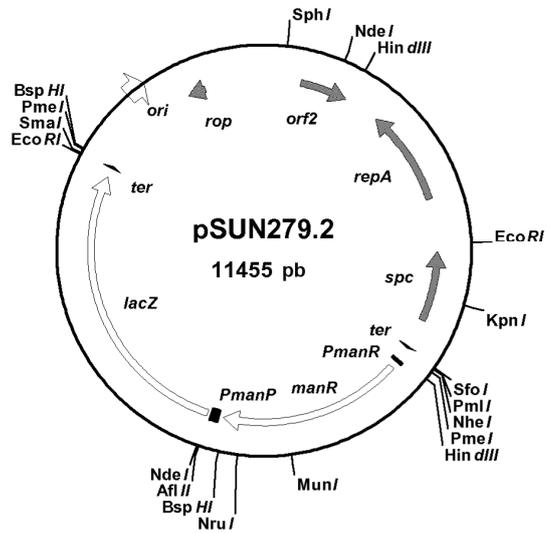


Fig. 6

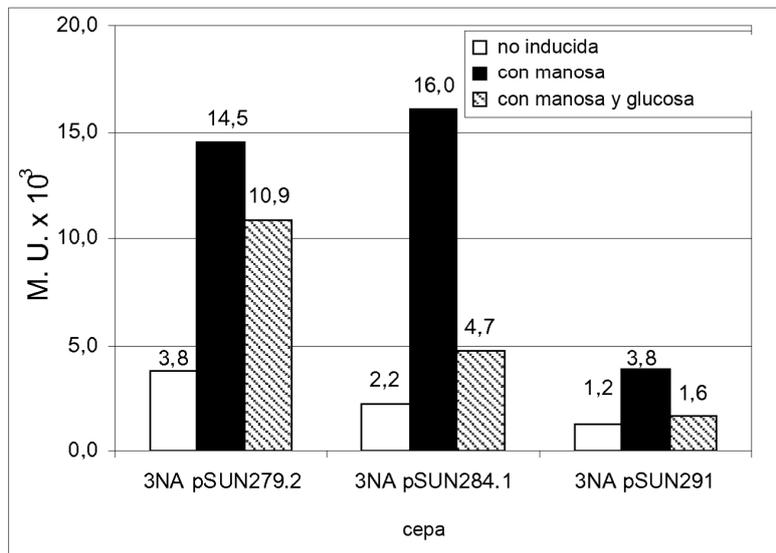


Fig. 7

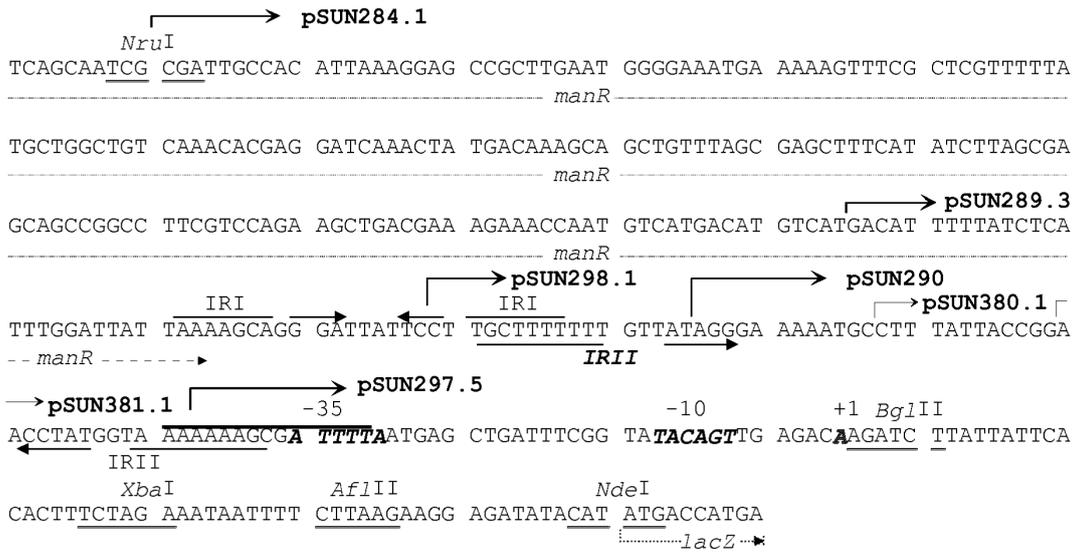


Fig. 8

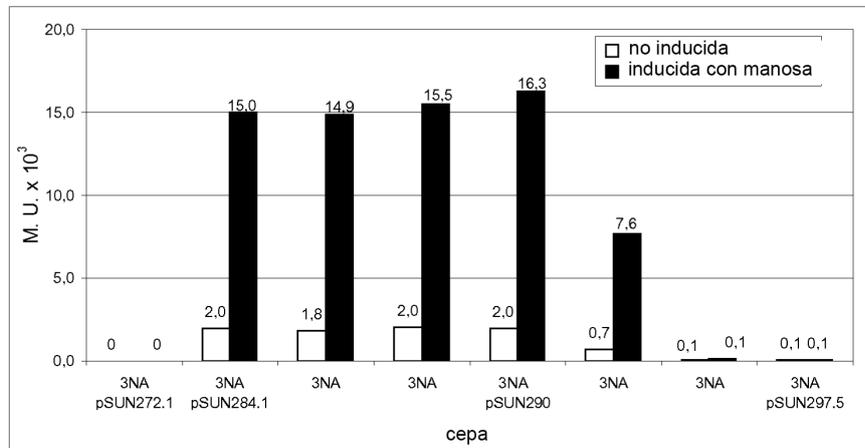


Fig. 9

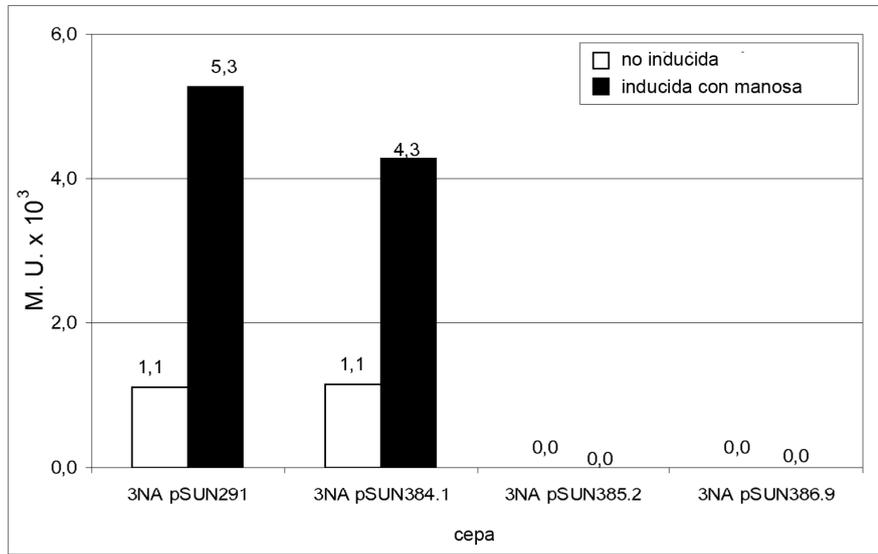


Fig. 10

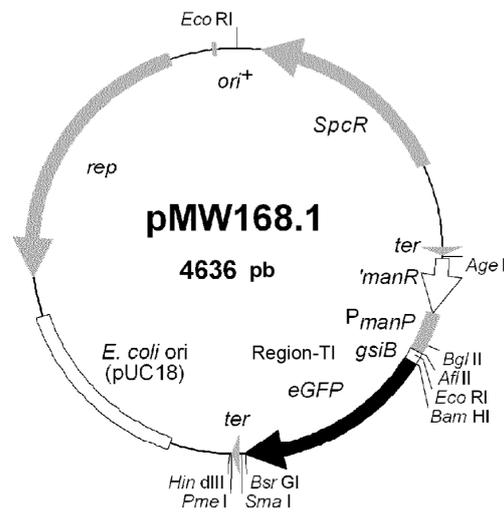


Fig. 11

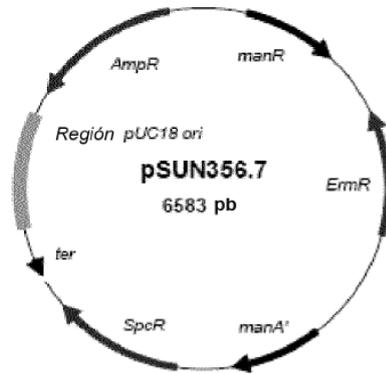


Fig. 12

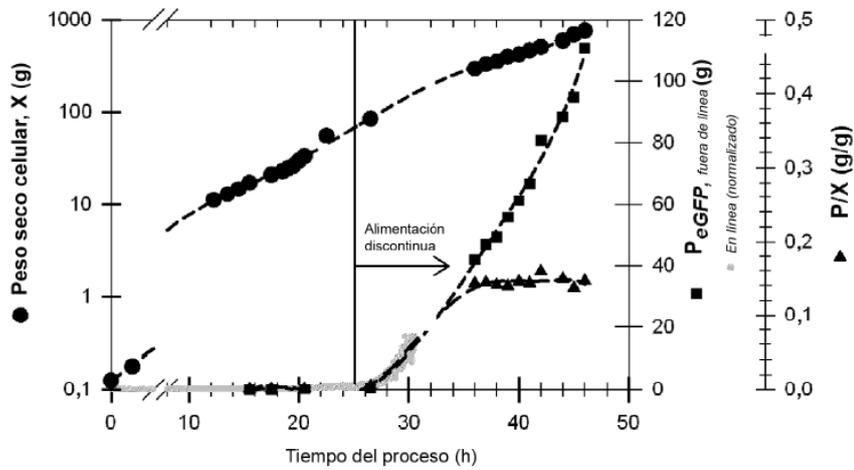


Fig. 13

Fermentación de alimentación discontinua de *B. subtilis* TQ356/pMW168.1. El peso seco celular (X, círculos negros), la cantidad total producida de eGFP (P_{eGFP} , cuadrados negros) y el rendimiento del producto (P/X, triángulos negros) se representan gráficamente frente al tiempo de fermentación. El comienzo de la fase de alimentación discontinua se indica mediante una línea vertical.

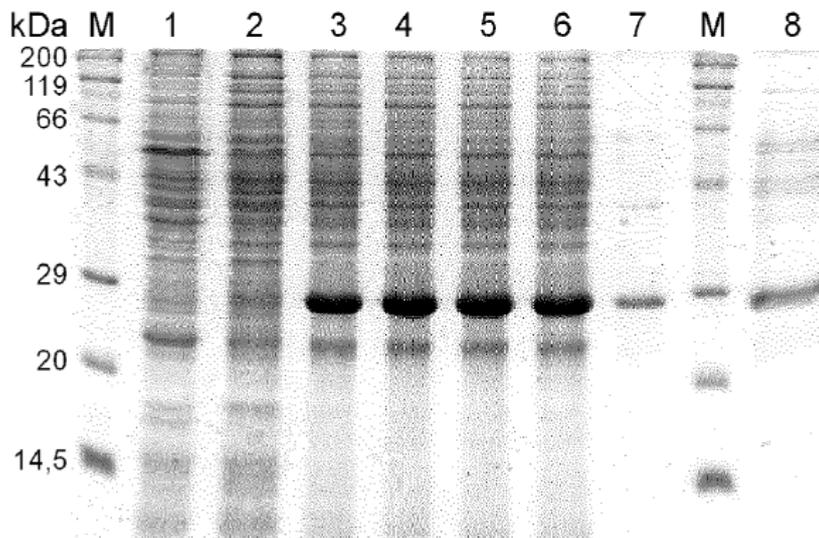
**Fig. 14**

Figura 14: SDS-PAGE de las muestras de células tomadas de la fermentación con *B. subtilis* TQ356/pMW168.1. Carriles 1-8: marcador de peso molecular de proteínas Roti®-Mark STANDARD; 1: después de 12,5 h (discontinuo); 2: después de 20,5 h (discontinuo); 3: después de 36 h (13,5 h de alimentación discontinua); 4: después de 41 h (18,5 h de alimentación discontinua); 5: después de 44 h (21,5 h de alimentación discontinua); 6: después de 46 h (23,5 h de alimentación discontinua, final del proceso); 7: después de 46 h, fracción insoluble; 8: después de 46 h, sobrenadante del cultivo.

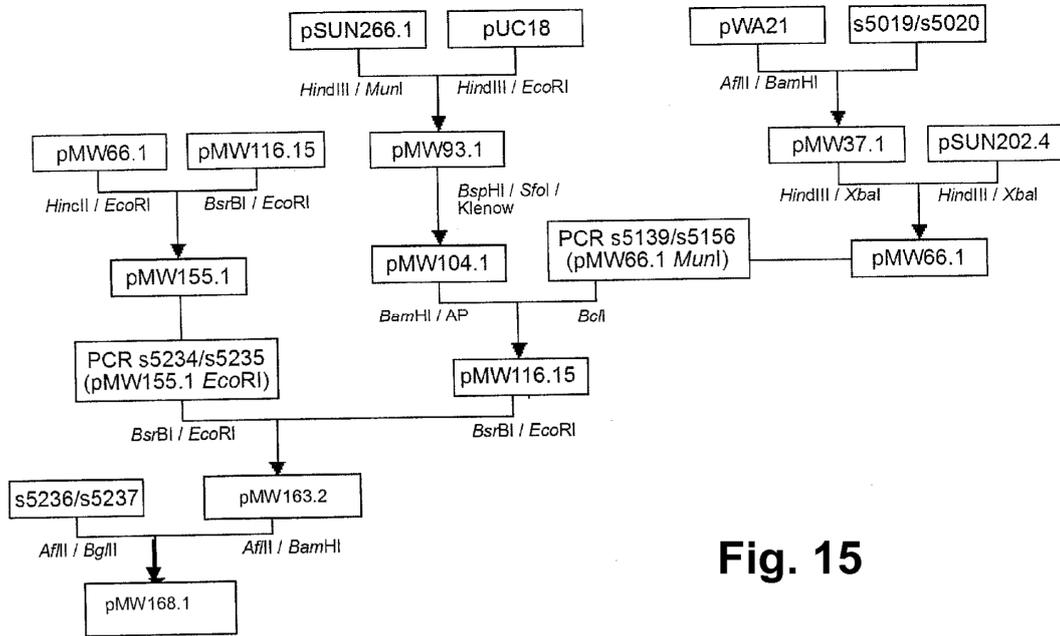


Fig. 15